

Aus der Klinik für Innere Medizin I  
der Medizinischen Fakultät der Universitätskliniken des Saarlandes,  
Homburg/Saar  
Prof. Dr. med. Gerhard Held

**Selektion, Generierung und Charakterisierung von MHC-peptid-  
spezifischen Antikörpern, die das Epitop 495-503 von Tegumentprotein  
pp65 des Cytomegalievirus im Kontext von HLA-A\*0201 erkennen**

DISSERTATION  
zur  
Erlangung des Grades eines Dr. med.  
der Medizinischen Fakultät der  
Universität des Saarlandes

vorgelegt von  
Willy Müller

**HOMBURG 2015**

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Deutsch	1
1.2	Englisch	2
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
2.1	Einführung	3
2.2	Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch MHC-I-Moleküle	4
2.3	Aufbau von Antikörpern	6
2.4	Zielantigen: Peptidsequenz NLVPMVATV	7
2.5	Herstellung von MHC-Peptid-spezifischen Antikörpern und deren Fragmenten	7
2.6	Aufbauprinzipien und Verwendung einer Phagenbibliothek	9
2.7	Ziel der Arbeit	12
<b>3</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>13</b>
3.1	Geräte	13
3.2	Bakteriophage	13
3.3	Analysesoftware	14
3.4	Zellen, Bakterien	14
3.5	MHC-Peptid-Komplex mit pp65 <sub>495-503</sub> von CMV	14
3.6	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits	15
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>20</b>
4.1	Zellkultivierung und Zellpräparierung	20
4.2	Phagemidbank und MHC-Peptid-Komplexe	20

4.3	Agarosegelelektrophorese zur DNA-Trennung	21
4.4	Phagendisplay	22
4.4.1	Prinzip des Phagendisplay	22
4.4.2	Bakterienanzucht zur Phagenamplifikation und –titration	23
4.4.2.1	Phagen-Titration	23
4.4.2.2	Phagen-Amplifikation	24
4.4.3	Präparation („Rescue“) der Phagen	25
4.4.4	Selektion zur Anreicherung antigenspezifischer Phagen	26
4.4.5	Produktion von einzelnen Phagen-Klonen	27
4.5	ELISA der selektionierten Phagen und produzierten Fab	29
4.6	DNA Techniken	31
4.6.1	PCR	31
4.6.2	DNA-Fingerprinting	32
4.6.3	Sequenzierung von DNA	33
4.7	Produktion von löslichen Fab-Antikörpern	33
4.7.1	Expression der löslichen Fab-Antikörper aus dem Periplasma	33
4.7.2	Reinigung der löslichen Fab-Antikörper	34
4.7.3	Auftrennung in der SDS-PAGE	35
4.7.4	Coomassie-Färbung	36
4.8	Oberflächenfärbung von Zellen und Durchflussscytometrie (FACS)	37
4.8.1	Oberflächenfärbung von Zellen	37
4.8.2	Durchflussscytometrie (FACS)	38
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
5.1	Selektion rekombinanter Fab-Antikörper gegen den Komplex HLA-A2/CMV-pp65 <sub>495-503</sub>	40
5.2	ELISA mit Fab-Phagen zur Spezifitätstestung	41
5.3	PCR und DNA-Fingerprint der 37 Fab-Phagen	44
5.4	Testung auf Monoklonalität	45

5.5	ELISA mit Fab-Phagen zur erweiterten Spezifitätstestung	46
5.6	Produktion von Fab-Antikörpern	49
5.7	Fab-ELISA	49
5.8	FACS-Analysen mit peptidgepulsten Zellen	51
5.9	DNA-Sequenzierung	59
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>78</b>

## 1 Zusammenfassung

### 1.1 Deutsch

Die Untersuchung der Antigen-Prozessierung und -Präsentation von Viren in ihren Wirtszellen ist von erheblichem Interesse. Der finale Schritt stellt die Präsentation eines viralen Peptides im Kontext eines MHC Klasse-I Komplex auf der Oberfläche der Zelle dar. Zur systematischen Untersuchung sind Reagenzien erforderlich, die spezifisch ein Peptid detektieren, das von einem MHC-Komplex präsentiert wird.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, aus einer großen, humanen Fab-Fragment Phagenbank Antikörper zu selektionieren und zu charakterisieren, welche spezifisch MHC-Peptid-Komplexe bestehend aus einem HLA-A\*0201-Molekül, sowie dem Peptid 495-503 des Tegumentphosphoprotein pp65 von CMV zu binden vermögen.

Zahlreiche Antikörper wurden selektioniert und einer umfangreichen Analyse ihrer Bindungseigenschaften unterzogen. Der Fab-Antikörper H11 interagiert mit dem MHC-Peptid Komplex nicht nur in seiner rekombinanten, löslichen Form, sondern auch mit der nativen Variante wie sie auf der Oberfläche HLA-A\*0201-exprimierender Zellen präsentiert wird. Die Ergebnisse belegen eine Peptid- und HLA-Allel-spezifische Interaktion mit dem MHC-Komplex.

Zusammengefasst stellt der in dieser Arbeit generierte und charakterisierte Antikörper ein Reagenz mit exklusiver Spezifität eines T-Zell Rezeptors dar, mit dem immunologische Fragestellungen zukünftig bearbeitet werden können. Seine Relevanz wird durch einen potentiellen therapeutischen Einsatz weiter gesteigert.

## 1.2 Englisch

Studies of antigen processing and presentation of viruses in host cells are of substantial interest. The final step of this process is the presentation of a virus-derived peptide in the context of MHC class-I complex on the surface of cell. For further research reagents are required which react specifically with the peptide when displayed by the MHC complex like naturally T-cell receptors do.

The intention of our work was to select and characterize Fab-antibodies by phage-display technology which specifically bind MHC-peptide-complexes consisting of an HLA-A\*0121-molecule and the peptide 495-503 of the tegument phosphoprotein pp65 of CMV.

Numerous antibodies were selected out of a large naïve human Fab fragment phage library and tested in a comprehensive analysis for their binding properties. The Fab-antibody H11 not only recognize the cognate MHC-peptide complex in a recombinant soluble form but also the native complex as displayed on the surface of HLA-A\*0201-expressing cells indicating the peptide- and HLA-allele-specific interaction with the MHC complex.

In summary, our work generated and characterized a Fab-antibody with exclusive T-cell receptor-like specificity for further immunological research. Its relevance is further emphasized by its potential therapeutic use.

## 2 Einleitung

### 2.1 Einführung

Die Immunität des Menschen ist zu einem Teil antigen-unspezifisch (angeborene Immunität) und andernteils antigen-spezifisch (adaptive Immunität). Träger der unspezifischen Abwehr sind humorale Faktoren, das Komplementsystem sowie auf Zellebene Granulozyten und phagozytierende Makrophagen. Adaptierte Immunreaktionen werden hauptsächlich von B- bzw. T-Zellen vermittelt. Die Antigenrezeptoren von B-Lymphocyten stellen Immunglobulinmoleküle dar. Sie binden überwiegend unprozessierte Proteine oder Glykoproteine und sezernieren nach ihrer Aktivierung Immunglobuline als lösliche Antikörper. Im Gegensatz hierzu ist der Rezeptor von T-Zellen der T-Zell-Rezeptor (TZR), welcher proteolytische Peptid-Fragmente prozessierter Proteine erkennt, die im Kontext eines Major Histokompatibilitätskomplexes (MHC) präsentiert werden. T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, die pathogene Zellen abtöten können, oder zu T-Helferzellen, die bei der Differenzierung von B-Zellen zu antikörperbindenden Plasmazellen beteiligt sind. Bei den Interaktionen der verschiedenen Abwehrzellen spielen somit zwei Oberflächenrezeptoren eine wesentliche Rolle [Klinke R & Silbernagl S, 2003]:

- T-Zell-Rezeptoren (TZR)
- HLA-I und HLA-II-Moleküle

T-Zell-Rezeptoren sind Heterodimere ( $\alpha\beta$  oder  $\gamma\delta$ ) auf der Oberfläche von T-Zellen. Wird auf der T-Zelle zusätzlich ein CD8-Korezeptor exprimiert, entwickelt sich die T-Zelle zur zytotoxischen T-Zelle. Im Falle eines CD4-Korezeptors mündet die Entwicklung in eine T-Helferzelle. Zytotoxische T-Zellen erkennen mit ihrem TZR ein antigenes Peptid im Kontext des MHC-Komplexes auf der Oberfläche einer Zelle und lysieren diese T-Helferzellen und regulieren das Wechselwirken der verschiedenen Immunzellen. T-Zell-Rezeptoren weisen in der Grundstruktur eine Ähnlichkeit zu den membranständigen Immunglobulinen der B-Zellen auf. Sie erkennen aber nicht, im Gegensatz zu den Antikörpern, isoliertes Antigen, sondern binden an Antigenfragmente, die in sogenannten MHC-Molekülen eingebettet sind. MHC-Moleküle sind membrangebundene Glykoproteine, die von einer Gruppe von Genen

mit der Bezeichnung Majorhistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) kodiert werden. Diese Moleküle werden auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen oder B-Zellen präsentiert. Sie sind maßgeblich für Immunerkennung, Gewebeverträglichkeit bei Transplantationen und die immunologische Individualität verantwortlich. So können intrazelluläre Infektionen durch die Präsentation von zytoplasmatischen Antigenen auf der Zelloberfläche im Komplex MHC-Molekül/Antigenpeptid von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden und eliminiert werden [Townsend et al., 1986].

## 2.2 Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch MHC-I-Moleküle

Das wichtigste Merkmal der Antigenerkennung durch T-Zellen ist die Form des Liganden, der vom TZR erkannt wird. Dieser besteht aus einem Peptid, das aus einem fremden Antigen stammt, und in der peptidbindenden Furche eines MHC-Moleküls gebunden ist. Das MHC-Molekül bindet dabei das Peptid intrazellulär und befördert es an die Zelloberfläche. Es existieren dabei zwei verschiedene Klassen von MHC-Molekülen, MHC-I und MHC-II-Moleküle, welche Peptide von Proteinen binden, die an unterschiedlichen Stellen innerhalb der Zellen prozessiert wurden.

Im Folgenden soll der Weg der Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch MHC-I-Molekülen beschrieben werden.

MHC-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Die höchste Expression findet man jedoch in hämatopoetischen Zellen. Die Moleküle dieser Klasse bestehen aus zwei Polypeptidketten: eine größere, im MHC-Genlocus codierte,  $\alpha$ -Kette sowie das kleinere, nicht im MHC-Genlocus codierte,  $\beta$ 2-Mikroglobulin [White et al., 1999]. Das  $\beta$ 2-Mikroglobulin wird dabei nichtkovalent der  $\alpha$ -Kette, welche die Zellemembran durchspannt, angelagert. Das vollständige MHC-Molekül besitzt schließlich vier Domänen, wobei drei davon von der  $\alpha$ -Kette und eine vom  $\beta$ 2-Mikroglobulin gebildet werden. Dabei haben die  $\alpha$ 3-Domäne sowie die des  $\beta$ 2-Mikroglobulin eine den Immunglobulinen sehr ähnliche Struktur. Die Domänen  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3 bilden die Wände eines Spaltes auf der Moleküloberfläche [Catipovic et al., 1994; Fremont et al., 1992]. Dieser Spalt stellt letztlich die peptidbindende Stelle des MHC-Moleküls dar, dort befinden sich die für die Antigenvariabilität verantwortlichen Polymorphismen [Johansen et al., 1997].



Liganden für MHC-I-Moleküle können verschiedenen Quellen entstammen, beispielsweise zytosolische Proteine endogener oder viraler Herkunft, defekte Proteine aus der Translation (DriPs, *defective ribosomal products*) oder auch durch Endozytose ins Zytosol transportierte Proteine. Unabhängig von ihrer Herkunft gelangen im Zytosol befindliche Proteine, welche für die MHC-I-Präsentation vorgesehen sind, nach Ubiquitinierung ins Proteasom. Dieses stellt einen großen multikatalytischen Proteasenkomplex aus vier Ringen zu je ungefähr sieben Untereinheiten mit einem röhrenförmigen Zentrum dar, welches von den proteolytischen Untereinheiten ausgekleidet wird. Dort werden die jeweiligen Proteine in einzelne 10-20 Aminosäuren lange Peptide gespalten, im Zytosol anschließend durch dortige Proteasen am N-terminalen Ende nachbearbeitet und schließlich in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert [Niedermann et al., 1999; York et al., 1999]. Dieser Transport kann ATP-abhängig oder –unabhängig geschehen. Der ATP-abhängige Weg erfolgt überwiegend mittels zweier Transportproteine, welche als TAP-1 und TAP-2 (*transporters associated with antigen processing*) bezeichnet werden. Dieser Transportmechanismus weist eine gewisse Spezifität gegenüber Peptiden mit einer Länge von acht oder mehr Aminosäuren mit hydrophoben oder basischen Aminosäuren am Carboxylende auf. Im ER schließlich erfolgt eine letzte Bearbeitung der Peptide, bevor diese dann an sich dort befindlichen neu synthetisierten MHC-I-Molekülen binden. Dazu muss sich zuerst das  $\beta$ 2-Mikroglobulin an die MHC-I- $\alpha$ -Kette anlagern, erst dann kann das Peptid gebunden werden. Der nun vollständige MHC-Peptid-Komplex kann schließlich das ER verlassen und wird über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert.

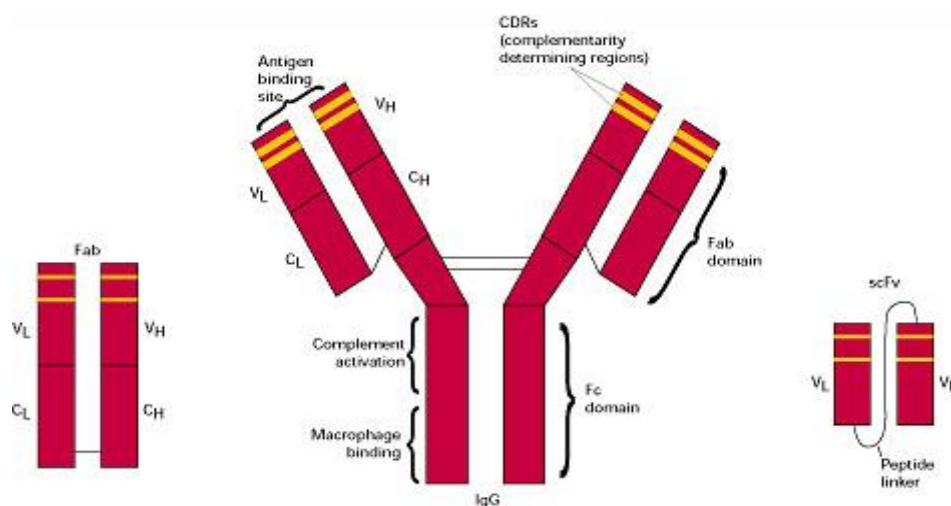
Hierbei können nur solche MHC-I-Moleküle an die Zelloberfläche gelangen, welche ein Peptid gebunden haben. Dies kann mit Hilfe TAP-defekter Zellen gezeigt werden, welche trotz korrekter Synthese der MHC-Moleküle nur sehr wenig MHC-I-Peptid-Komplexe auf ihrer Zelloberfläche besitzen [Yewdell et al., 1997]. Beim Menschen lagern sich neu synthetisierte  $\alpha$ -Ketten im ER mit einem Chaperon-Protein namens Calnexin zusammen. Nach Assoziation mit dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin dissoziiert das Heterodimer von Calnexin und lagert sich an einem Protein-Komplex aus Calreticulin, dem TAP-assoziierten Protein Tapasin sowie Erp57 an und löst sich von

diesem erst wieder nach erfolgter Bindung eines Peptids [Li et al., 2000; Pamer & Gresswell, 1998; Stern & Wiley, 1994].

### 2.3 Aufbau von Antikörpern

Antikörper sind Glykoproteine aus der Gruppe der Immunglobuline (Ig). Sie werden nach Antigenkontakt aus vorprogrammierten B-Zellen, die sich selektiv vermehren und differenzieren, freigesetzt. Die Immunglobuline lassen sich in fünf Klassen (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) untergliedern. IgG stellt im Organismus den weitaus größten Anteil.

Der Aufbau von IgG-Antikörpern gliedert sich in zwei baugleiche Leichtketten und zwei baugleiche Schwereketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.



**Abbildung 1: Aufbau eines Antikörpers und antigenbindende Antikörperfragmente Fab, scFv und dsFv [Roth, 2001]**

Beide Ketten bestehen aus variablen und konstanten Bereichen. Die variablen Bereiche  $V_L$  und  $V_H$  bestimmen die Spezifität der Antigenerkennung. Die Variabilität der V-Regionen ist strukturiert in nahezu konstante Regionen (*Framework regions: FWR1 – FWR4*) und hypervariablen Regionen (*complementarity determining regions: CDR1 – CDR3*). Die Größe der variablen Domänen ( $V_L$  und  $V_H$ ) sowie der konstanten Domänen ( $C_{H1} – C_{H3}$ ) umfasst jeweils ca. 25 kDa.

Die beiden variablen Domänen  $V_L$  und  $V_H$ , verbunden mit einem Peptidlinker, werden als *single chain Fragment variable* (scFv) bezeichnet. Ein scFv zuzüglich den

konstanten Domänen  $C_{H1}$  und  $C_L$  wird als Fab (fragment antigen binding) benannt. Sowohl scFv als auch Fab tragen die komplette Antigen-Spezifität wie der vollständige Antikörper.

Die CDRs der V-Region lagern sich in Peptidschleifen zusammen und bilden so die Paratope, die mit den Antigen-Epitopen die maßgebliche Wechselwirkung bestimmt. Das Zusammenspiel mehrerer intramolekularer Kräfte wie Coulombkräfte, Lifshitz-van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophobe Wechselwirkungen bestimmt die Bindungsaffinität und -selektivität eines Antikörpers bzw. seiner Fragmente.

## 2.4 Zielantigen: Peptidsequenz NLVPMVATV

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) ist ein speziesspezifisches DNA-Virus, welches zur Familie der Herpesviren gehört. Eine Erstinfektion bei Immunkompetenten verläuft in der Regel asymptomatisch und mehr als die Hälfte der Bevölkerung in den industrialisierten Ländern ist infiziert. Das Virus persistiert lebenslanglich. HCMV-spezifische CD8-Zellen verhindern einen HCMV-Krankheitsbefall und verantworten auch die Aufrechterhaltung der HCMV-Latenz [Wills MR et al., 1996]. Eine lange währende HCMV-Infektion führt zu einem bedeutsamen Wandel in der Zusammensetzung des CD8-T-Zell-Repertoires [Almanzar G et al., 2005].

Das immundominante Epitop für das HLA-A\*0201 restringierte T-Zell Repertoire ist das Peptid NLVPMVATV, ein Teil des HCMV-Tegumentproteins pp65 (pp65<sub>495-503</sub>). Im Verbund mit dem Komplex HLA-A\*0201 stellt es das Untersuchungsepitop in der vorliegenden Arbeit dar. Der Komplex HLA-A\*0201 wurde gewählt, weil er den mit 28% am meisten exprimierten Phänotyp der kaukasischen Population darstellt [Mori M, 1997].

## 2.5 Herstellung von MHC-Peptid-spezifischen Antikörpern und deren Fragmenten

Die Herstellung und Charakterisierung peptid-spezifischer Antikörper gegen HLA-Moleküle ist für die Forschung, Diagnostik und Therapie von großer Bedeutung. Dank ihrer löslichen Natur, hohen Affinität und Stabilität könnten sie in verschiedenen

biochemischen Verfahren wie der Immunpräzipitation oder der Immunhistochemie eingesetzt werden, um T-Zell-Epitope auf Antigen-präsentierenden Zellen zu detektieren und zu charakterisieren. Dies würde die Möglichkeit eröffnen, die Grundlagen der Wechselwirkung zwischen T- und HLA-präsentierenden Zellen ohne Einsatz relativ schwierig rekombinant herzustellenden und niedrig-affinen T-Zell-Rezeptoren qualitativ und quantitativ zu erkunden [Rudolph et al, 2006]. In der Therapie könnte mit Hilfe derartiger Antikörper die unerwünschte T-Zell-Immunantwort, die bei Autoimmunität auftritt, blockiert werden. Außerdem könnten solche Antikörper Toxine zum Zielort transportieren und dadurch die Vernichtung von z. B. Tumorzellen hervorrufen [Aharoni et al., 1991].

Mit Hilfe der Produktion von Myelomhybriden konnte eine ganze Reihe von monoklonalen Antikörpern hergestellt werden, deren Spezifität gegen MHC-Klasse-I-Antigene gerichtet ist. Es ist jedoch nur in einigen wenigen Fällen gelungen, Reagenzien herzustellen, die mit einem bestimmten MHC-Molekül auf peptid-spezifische Weise, d.h. wie T-Zell-Rezeptoren, reagieren [Aharoni et al., 1991]. Die Schwierigkeiten sind u.a. darauf zurückzuführen, dass die Erkennungsbereiche von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren eine unterschiedliche Topologie aufweisen. Immunglobuline erkennen in der Regel nach außen gewölbte Moleküloberflächen [McCallum et al., 1996]. Da die Peptide tief in der Spalte eines HLA-Proteins liegen, tragen sie wenig zur Antigenität des gesamten MHC-Peptid-Komplexes bei. Deshalb erkennen Antikörper in erster Linie den HLA-Anteil eines HLA-Peptid-Komplexes. T-Zell-Rezeptoren werden jedoch im Thymus so selektioniert, dass sie in der Lage sind, sowohl das HLA-Molekül als auch das gebundene Peptid zu erkennen [von Boehmer H, 1994]. Es ist auch zweckmäßig, dass B-Zellen bzw. Antikörper nicht darauf ausgerichtet sind, HLA-Peptid-Komplexe zu erkennen, um T-Zell-Epitope nicht zu blockieren.

Die Einführung der Hybridoma-Technologie ermöglichte es, monoklonale Antikörper herzustellen, welche dank ihrer einzigartigen Spezifität und Affinität als immunodiagnostische und ansatzweise auch als therapeutische Reagenzien eine breite Verwendung gefunden haben. Die Anwendung monoklonaler Antikörper tierischen Ursprungs (meistens von Nagern) in der Humantherapie ist jedoch problematisch, weil sie beim Menschen eine Immunantwort provoziert. Die Herstellung so genannter chimärer Immunglobuline, die sich aus variablen murinen und konstanten humanen Regionen zusammensetzen, verringerte die

Immunogenität derartiger Antikörper stark, eliminierte sie jedoch nicht vollständig [Brüggemann et al., 1989]. Die Herstellung von menschlichen, monoklonalen Antikörpern mittels Hybridoma-Technologie ist mit verschiedenen technischen Problemen verbunden. Es gibt sehr wenige geeignete Fusionspartner für eine humane B-Zelle, um eine stabile Myelomzelle zu bilden. Außerdem weist ein Maus/Mensch-Myelomhybrid typischerweise eine niedrige oder instabile Antikörperproduktion auf. Hinzu kommt noch das ungelöste ethische Problem der Immunisierung eines Menschen mit bestimmten Antigenen. Darüber hinaus schließt der Toleranzmechanismus die Ausbildung monoklonaler Antikörper gegen körpereigene Proteine aus. Mit der Verwendung von Phagenbibliotheken sollte es prinzipiell gelingen, diese Nachteile zu umgehen und menschliche Antikörper bzw. antikörperähnliche Proteine in vitro herzustellen [Winter & Milstein, 1991].

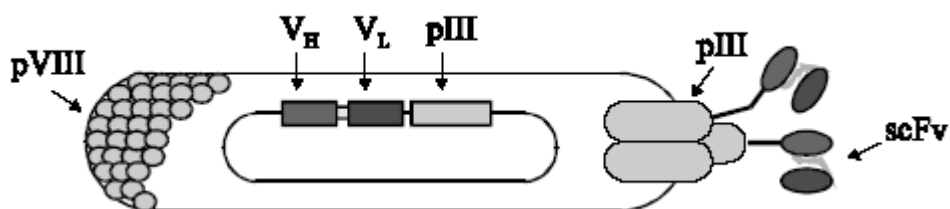
## 2.6 Aufbauprinzipien und Verwendung einer Phagenbibliothek

Das Prinzip einer Phagenbibliothek beruht auf der Nachahmung des in-vivo-Selektionsprozesses im Immunsystem. Ein Repertoire von Antikörper-Fragmenten (scFv oder Fab) wird auf der Oberfläche filamentöser Phagen exprimiert, wobei jeder Phagenpartikel nur ein Antikörperfragment einer distinkten Spezifität trägt. Die Bibliothek wird durch die Bindung der Phagenpartikel an ein Antigen selektioniert. Mit den auf diese Weise angereicherten Phagen werden anschließend Bakterien infiziert, um anschließend wieder amplifiziert zu werden [Übersicht in Winter et al., 1994]. Die Affinitätsreifung der gewonnenen Fragmente, die bei Immunglobulinen durch somatische Mutationen verursacht wird, kann durch Punktmutationen oder den Austausch der Ketten erhöht werden. Bei der Herstellung und Verwendung von Phagenbibliotheken werden zwei technologische Errungenschaften genutzt: die Amplifizierung eines Repertoires von VH- und VL-Genen aus Antikörperproduzierenden Zellen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die Möglichkeit, kurze Peptide auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen zu exprimieren [Smith, 1997].

Die filamentösen Bakteriophagen M13, fd und fl gehören zu einer Gruppe engverwandter Viren, die gram-negative Bakterien infizieren, ohne sie zu lysieren. Das Genom eines filamentösen Phagen besteht aus etwa 6400 Nukleotiden und

kodiert für zehn Proteine. Die Phagenhülle wird aus dem Produkt des Gens VIII (pVIII), das in etwa 3000 Kopien vertreten ist, und aus den Produkten der Gene III (pIII), VI, VII und IX, die jeweils etwa in Form von fünf Proteinen vertreten sind, zusammengesetzt. Das Hauptprotein pVIII ist für die Umhüllung der einzelsträngigen DNA verantwortlich. Das Protein pIII wird auf der Spitze des Phagenpartikels exprimiert und ist für die Infektion von Bakterien verantwortlich. Es koppelt an den F-Pilus der Bakterienmembran. Ein Protein kann an das N-terminale Ende von pIII fusioniert werden, ohne die Morphogenese und die Infektionsfähigkeit des Phagen zu beeinträchtigen. Auf der Phagenoberfläche können jegliche Art Plasmid-kodierte Peptide oder Proteine exprimiert werden. In der Antikörpertechnologie sind dies überwiegend scFv- und Fab-Fragmente [Hoogenboom et al., 1991].

Für die Expression auf Phagen werden die für Antikörperfragmente kodierenden Gene und das GenIII (gIII) in ein chimärisiertes Plasmid, genannt Phagemid, kloniert. Dieses Plasmid enthält sowohl einen Replikationsursprung für Plasmide als auch den Phagen-Replikationsursprung [Hoogenboom et al., 1991]. Phagemide vermehren sich in einer Wirtszelle wie doppelsträngige Plasmidmoleküle. Werden die Zellen jedoch gleichzeitig mit einem Helferphagen infiziert, so vermehren sich die Phagemide wie ein Einzelstrang-DNA-Bakteriophage. Die DNA eines Helferphagen enthält die genetische Information für alle Phagenproteine, die für die Verpackung und Sekretion von Phagenpartikeln nötig sind, hat jedoch einen defekten Replikationsursprung, wodurch sie mit einer niedrigeren Effektivität als das für das scFv/pIII-Fusionsprotein kodierende Phagemid repliziert wird. Am Ende entsteht ein infektiöser Phagenpartikel, der sowohl pIII als auch das fusionierte Protein scFv/pIII präsentiert und das für das Fusionsprotein kodierende Phagemid trägt.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung eines scFv-exprimierenden Phagenpartikels**

Manche Phagemide haben ein Amber-Stopcodon zwischen den Antikörperketten und dem pIII-Gen [Hoogenboom et al., 2000]. Dies erlaubt eine Umschaltung von der Expression des Fusionproteins zur Produktion eines löslichen Antikörperfragments in einem nicht-suppressiven Stamm. Ein Repertoire der VH- und VL-Gene kann aus der Population peripherer B-Zellen (PBL) isoliert und zur Konstruktion einkettiger variabler Domänen (z. B. Fab-Fragmenten) verwendet werden. Eine zufällige Kombination der schweren und leichten Ketten führt dabei zur Entstehung einer Bibliothek von Antikörper-Fragmenten verschiedener Spezifität [Huse et al., 1989]. Die Expression einer Bibliothek mit sehr großer Diversität auf der Oberfläche von Phagen bietet die Möglichkeit, mit Selektionstechniken Reagenzien zu erzeugen, die prinzipiell jedes beliebige Antigen erkennen können sollten.

## 2.7 Ziel der Arbeit

Grundlage immuntherapeutischer Ansätze ist die Präsentation von Antigenen auf Zelloberflächen und die Erkennung der Präsentation durch das Immunsystem. Effektiv kann eine zytotoxische Immunantwort nur sein, wenn die antigenpräsentierenden Zellen die Antigene im Kontext mit Major-Histokompatibilitäts-Komplexen präsentieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Antikörperkonstrukte entwickelt werden, die es erlauben, eine MHC-Präsentation der **Peptidsequenz 495-503 des Tegumentproteins pp65 vom Cytomegalievirus** nachzuweisen. Die Möglichkeit, die Präsentation dieses Peptids oder sein Fehlen, zu detektieren, stellt ein Instrumentarium in der Untersuchung der Antigen-Prozessierung und -Präsentation dar.

Phagenbibliotheken menschlicher Fab-Fragmente ermöglichen es, spezifische Antikörperfragmente gänzlich *in vitro* zu gewinnen und auf das aufwändige Verfahren der Hybridoma-Technologie zu verzichten.

Vorliegende Arbeit behandelt folgende Aufgabenstellung:

**Selektion, Generierung und Charakterisierung von MHC-peptid-spezifischen Antikörpern, die das Epitop 495-503 von Tegumentprotein pp65 des Cytomegalievirus im Kontakt von HLA-A\*0201 erkennen**

Dazu sollen für genanntes Epitop spezifische Fab-Antikörper aus einer Phagemidbank [deHaard et al., 1999] mittels Phagen-Display selektioniert werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollen die isolierten Fab-Fragmente durch Sequenzierung und Bindungstests näher charakterisiert werden.

Das beschriebene Epitop entspricht der Aminosäuresequenz NLVPMVATV und wird auf HLA-A\*0201 präsentiert.



### 3 Material

#### 3.1 Geräte

**Tabelle 1: Geräte**

Gerät	Firma
Agarose-Gelelektrophorese	BioRad, München
PCR-Termocycler	MJ Research Peltier Thermal Cyclers-200, USA
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
FACS	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Photometer	GeneQuant pro, Amersham Biosciences, Freiburg
ELISA-Reader Wallac	PerkinElmer, Finnland

#### 3.2 Bakteriophage

Als Bakteriophagen oder einfach Phagen (von griechisch phagein: fressen) bezeichnet man eine Gruppe von Viren, die auf Bakterien als Wirtszellen spezialisiert sind.

In dieser Arbeit wurde der E.coli-Bakteriophage M13 verwandt. Der Phage umschließt ein einzelsträngiges ringförmiges Genom von ca. 6700 bp bei 7 nm im Durchmesser und 2 µm in der Länge. Er gehört zur Gruppe der Ff-Phagen. F steht für die Interaktion des Phagen mit dem F-Pilus des E.coli und f für den filamentösen Aufbau des Phagen.

Nach Infektion des Bakteriums mit dem F-Pilus wird die Phagen-DNA (11 Gene auf Genom) in das Bakteriengenom integriert, darunter auch das Phagenhüllprotein pIII als potentieller Fusionspartner für u. a. Antikörperfragmente zur Präsentation an der Oberfläche der Phagen. Zehn Minuten nach Infektion der Bakterien werden 1000fach in erster Generation Phagenpartikel ausgeschleust [Modell & Russel, 1988].

### 3.3 Analysesoftware

Die Daten der Messungen mit dem FACS-Durchflußzytometer wurden mit der Software des Herstellers (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

### 3.4 Zellen, Bakterien

**Tabelle 2: Zelllinien und Bakterien**

<b>Zellen</b>	
T2-Zellen (HLA-A0201-positive TAP-defiziente humane Lymphoblastenlinie)	DSMZ-Nummer: ACC 598
HEK-Zellen	human embryonic kidney 293 Zellen
stabil transfizierte HEK-Zellen	freundlicherweise von Fr. Prof. Martina Sester zur Verfügung gestellt
LCL-Zellen	EBV-immortalisierte B-Zellen
<b>Bakterien</b>	
Escherichia coli	TG 1

### 3.5 MHC-Peptid-Komplex mit pp65<sub>495-503</sub> von CMV

MHC-Peptid-Komplexe stellen die Antigene dar, gegen welche Antikörper selektioniert werden. Die Komplexe werden als biotinylierte Monomere verwendet ( $c_{\text{MHC-Ag}} = 1.1 \text{ mg/ml}$ ) und wurden von Immanuel Luescher, Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne (Schweiz), zur Verfügung gestellt.

Das in dieser Arbeit verwendete Peptid sowie benutzte Kontrollpeptide:

- Peptidfolge NLVPMVATV (495-503) des Tegumentproteins pp65 des humanen Cytomegalievirus
- Kontrollpeptid Tü 155, zur Verfügung gestellt von Prof. Andreas Ziegler, Berlin
- Kontrollpeptid W6/32, anti-human HLA-ABC Klasse I Schwereketten/2m-Antikörper, Dako Cytomotion
- Kontrollpeptid BB7.2, zur Verfügung gestellt aus onkologischem Labor, Uniklinik Homburg
- Flu (mit HLA-A\*0301 Schwereketten gefaltet)

Der in dieser Arbeit benutzte Haupthistokompatibilitätskomplex:

- HLA-A\*0201

### 3.6 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits

Die verwendeten Chemikalien, Fertiglösungen und Verbrauchsmaterialien genügten den geforderten Reinheitsstufen und wurden von folgenden Firmen bezogen: August Hedinger (Stuttgart), Biolab (München), Biomol (Hamburg), Delta Select (Pfullingen), DIFCO (Detroit, USA), Fluka (Neu-Ulm), GibcoBRL (Eggenstein), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (Vilnius), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Sartorius (Göttingen), Serva (Heidelberg) und Sigma (St. Louis, USA).

**Tabelle 3: Ausgewählte Materialien, jenseits des Standardlaborinstrumentariums**

GibcoBRL (Eggenstein)	Streptavidin-PE (1:200)
Zur Verfügung gestellt von Andreas Ziegler, Institut für Immungenetik, Charité- Universitätsmedizin Berlin, Freie Universität Berlin [Hutter et al, 1996]	Tü155
Amersham Pharmacia, Little Chalfont; UK	Helferphage M13K07 Anti-M 13
Clontech, Palo Alto, USA	TALON™ Resin
Dako Cytomotation, Glostrup, Dänemark	W6/32, Anti-Human HLA-ABC Klasse I Schwereketten/β2m-Antikörper Anti-Mouse IgG HRP
Fa. Jackson ImmunoResearch, USA	R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin, Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, F(ab') <sub>2</sub> Fragment Specific R-Phycoerythrin-conjugated AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG, F(ab') <sub>2</sub> Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG
GE Healthcare	Dynabeads M280 Streptavidin
Onkologisches Labor, Homburg/Saar	9E10 anti-c-myc BB7.2 (als Hybridomüberstand) Fab Antikörper b-3M4E5 (Held EJI 2004)
Pharmacia Biotech	Helferphage (M13K07)

Tabelle 4: Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Lösung	Ansatz
2xTY-Medium	16 g Trypton 10 g Yeast 5 g NaCl <i>in 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> autoklavieren</i>
2xTY AG	16 g Trypton 10 g Yeast 5 g NaCl <i>in 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> autoklavieren, nach dem Abkühlen 2% Glucose und Ampicillin 100 µg/ml dazugeben</i>
2xTY-AK	16 g Trypton 10 g Yeast, 5 g NaCl <i>in 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> autoklavieren, nach dem Abkühlen Ampicillin 100 µg/ml und Kanamycin 25 µg/ml dazugeben</i>
2xTY Ampicillin-Glucose-Agar	16 g Trypton 10 g Yeast, 5 g NaCl 15 g Agar <i>in 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> autoklavieren, auf etwa 55°C abkühlen lassen, 2% Glucose und Ampicillin 100 µg/ml dazugeben, in Petrischalen gießen</i>
Blaumarker und Ladepuffer für Agarosegele	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylenxyanol FF 0,25 % Orange G 1 mM EDTA 40 % Sucrose <i>in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> lösen</i>

Coomassie Färbelösung	0,04% Brilliantblue R (Coomassie) 40% (v/v) Methanol 10% Essigsäure <i>mit Wasser auf 500 ml auffüllen</i> <i>30 min bis 4 h rühren; filtrieren</i>
Coomassie Entfärbelösung	40% Methanol 10% Essigsäure <i>mit Wasser auf 500 ml auffüllen</i>
Ethidiumbromid	Lösung für die Zugabe zu Agarosegelen 1:1000 Verdünnung der Stammlösung (10 mg/ml)
PBS	8,75 g NaCl (= 750 mmol) 1,42 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (= 40 mmol) 0,22 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (= 7,8 mmol) <i>in 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> autoklavieren, ph-</i> <i>Wert zwischen 7,4-7,6 titrieren</i>
100 mM Imidazol	340 mg Imidazol pro 100 ml PBS
PEG/NaCl	20% Polyetyhlenglycol 6000 (PEG) 2,5 M NaCl <i>In 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> autoklavieren</i>
SDS 2x Proteinprobepuffer	0,6 ml Tris pH 6,0 1M 2,5 ml Glycerol 100 % 2,0 ml SDS 10 % 0,5 ml Bromphenolblau 2 % 3,9 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
TAE 50x Stammlösung	242 g TrisBase 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 <i>in 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> autoklavieren</i>

Kits für DNA- und ELISA-Techniken:

- Plasmidisolierungskits (Mini, Midi, Maxi)      Qiagen (Hilden)
- TMB-Peroxidase Kits (ELISA-Farbreaktion)      Kirkegaard&PerryLab

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultivierung und Zellpräparation

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C und einem Kohlendioxidanteil von 5 % kultiviert. Den T2-Zellen wurden ins RPMI-1640-Kulturmedium 10 % fetales Kälberserum (FCS) und 1 % L-Glutamin (2mM) zugesetzt. Von einer Beifügung von Penicillin und Streptomycin wurde zwecks besserer Kontrolle der Nichtkontamination bei den T2-Zellen abgesehen.

Als weiteres zelluläres Testsystem wurde die menschliche, embryonale Nierenzelllinie 293 (human embryonic kidney; HEK 293-Zellen) verwendet. Der HEK-Zelllinie, mit Peptid pp65 stabil transfiziert, wurde zur Vermeidung einer Kontamination noch Hygromycin (2,8 ml auf 500 ml DMEM) beigemischt sowie ebenfalls 10 % fetales Kälberserum (FCS) und 1 % L-Glutamin. Bei den unbeladenen HEK-Zellen konnte diese Antibiotikazugabe unterbleiben.

Die lymphoblastoiden LCL-Zellen, jeweils HLA-A2-positiv sowie -negativ, wurden ebenfalls in RPMI-1640-Kulturmedium mit 10 % FCS und 1% L-Glutamin (2mM) kultiviert.

Die T2-Zellen als auch die LCL-Zellen wurden exogen mit dem Untersuchungspeptid bzw. den Kontrollpeptiden gepulst. Die Peptide lagern sich entweder in die leeren Bindungsgruben der MHC-Komplexe oder verdrängen kompetitiv die darin sich befindenden Peptide.

### 4.2 Phagemidbank und MHC-Peptid-Komplexe

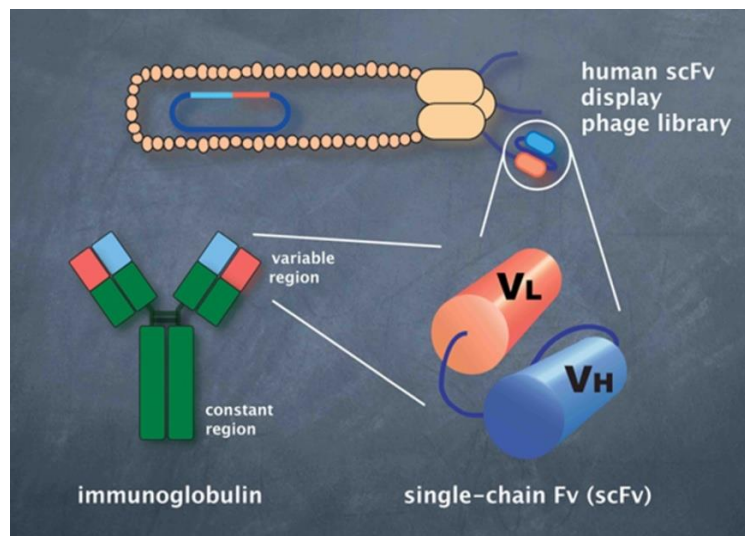
Dieser Arbeit lag eine Phagemidbank zugrunde, die ein sehr großes naives Fab-Repertoire mit einer Diversität von  $4,2 \times 10^{10}$  verschiedenen Fab-Antikörpern exprimiert. Die große Diversität erlaubt die Selektion von Antikörpern mit Spezifität für praktisch jedes Antigen [de Haard et al., 1999]. Die Phagemidbank wurde von DYAX sa, Liège (Belgien) zur Verfügung gestellt. Aliquots gelöster, infektiöser Phagen, die das komplette Phagenrepertoire enthielten, wurden von Prof. Dr. Gerhard Held produziert.



MHC-Peptid-Komplexe stellen die Antigene dar, gegen welche Antikörper selektioniert werden. Die Komplexe werden als biotinylierte Monomere verwendet ( $c_{\text{MHC-Ag}} = 1.1 \text{ mg/ml}$ ) und wurden von Immanuel Luescher, Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne (Schweiz), zur Verfügung gestellt.

Das in dieser Arbeit verwendete Peptid sowie benutzte Kontrollpeptide:

- Peptidfolge NLVPMVATV (495-503) des Tegumentproteins pp65 des humanen Cytomegalievirus
- Kontrollpeptid Tü 155, zur Verfügung gestellt von Prof. Andreas Ziegler, Berlin
- Kontrollpeptid W6/32, anti-human HLA-ABC Klasse I Schwereketten/2m-Antikörper, Dako Cytomotion
- Kontrollpeptid BB7.2, zur Verfügung gestellt aus onkologischem Labor, Uniklinik Homburg



**Abbildung 3: Bauschema eines scFv-Antikörperfragments auf einem Phagen mit entsprechendem scFv-Genloci im Phagemid**  
[Sugimura et al., 2001]

#### 4.3 Agarosegelelektrophorese zur DNA-Trennung

Ein elektrisches Feld lässt bei der Agarosegelelektrophorese negativ geladene DNA-Fragmente je nach Größe unterschiedlich weit im Gel wandern. Durch die

Verwendung von Ethidiumbromid (EtBr), eine sequenzunspezifisch an Nukleinsäuren interkalierende Substanz, die bei Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda=300$  nm) Licht der Wellenlänge 590 nm emittiert, können die Nukleinsäuren sichtbar gemacht und bezüglich Reinheit, Größe und Konzentration beurteilt werden.

Für DNA-Gele wurde 130 ml TAE-Puffer mit 4 g Agarose aufgekocht, nach Abkühlung auf etwa 60°C mit 65  $\mu$ l Ethidiumbromid versetzt und in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Als Elektrophoresepuffer diente 1xTAE-Puffer.

Zur Auftrennung wurden die Gele mit DNA-Proben beladen und die Nukleinsäuren bei 40-100 V in der Elektrophoresekammer laufen gelassen.

#### 4.4 Phagendisplay

##### 4.4.1 Prinzip des Phagendisplay

[Fischer P, 1996], [Smith GP, 1997]

Bei der phage-display Technologie werden Bakteriophagen an ihren Oberflächenproteinen hinsichtlich der Präsentation von antigenbindenden Strukturen verändert. Dazu wird das Gen, welches für die Oberflächenproteine kodiert, entsprechend modifiziert. In der vorliegenden Arbeit sind die antigenbindenden Strukturen Fab-Antikörperfragmente. Die zugrunde liegenden Inserts werden bei der Translation gleichsam abgelesen und der Fab wird derart in die Oberfläche des Phagen integriert, dass er auf der Phagenoberfläche in den Raum weist.

Eine Phagenbibliothek beinhaltet Phagen, die möglichst jeweils einen anderen Fab auf ihrer Oberfläche tragen. Die hier benutzte M13-Phagenbibliothek enthielt Fab-Antikörper mit einer Länge von ca. 50 kDa.

Basis des Displays von Antikörperfragmenten auf der Oberfläche von Bakteriophagen ist die Klonierung der Gensequenzen der Fab-Fragmente und einem Hüllprotein der Bakteriophagen. Pro Selektionsrunde, in der Fab-Phagen mit MHC-Peptid-Komplexen binden, resultiert eine Anreicherung von spezifisch

interagierenden Fab-Phagen. Nach Infektion dieser antigenbindenden Klone in E.coli, Titration und Amplifikation sowie Koinfektion mit Helferphagen M13K07 kommt es zu einer erneuten Produktion des Oberflächen-Fusionsproteins, bestehend aus dem Fab und dem Hüllprotein gIII des Bakteriophagen M13. Dieses Fusionsprotein wird in die infektiöse Hülle verpackt. Die spezifisch bindenden Phagen können in der Folge in weiteren Selektionsrunden angereichert werden.

#### 4.4.2 Bakterienanzucht zur Phagenamplifikation und -titration

Der E.coli-Stamm TG1 wird bei -70°C in Glycerinmedium gelagert. Bestimmte E.coli exprimieren unter bestimmten Bedingungen F-Pili; so auch der E.coli-Stamm TG1. Nach Anlagerung der Phagenhüllproteine pIII an die F-Pili der Bakterien gelangt der Phagemid des Bakteriophagen in die E.coli-Bakterien. Über die internalisierte DNA wird den Bakterien weiterhin eine Antibiotikaresistenz vermittelt.

Für die Vermehrung selektionierter Phagen sowie für die Titration zur Bestimmung der Effizienz der Selektionen mussten die Bakterien jeweils vorbereitet werden:

- Animpfung von 25 ml 2TY mit E.coli TG1 Kultur
- 12 h, 30°C, 270 U/min schütteln
- 500 µl Bakterienmedium in 50 ml 2TY in einem 250ml-Kolben (1:100)
- bei 37°C mit 270 U/min bis Absorption  $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$

##### 4.4.2.1 Phagen-Titration

Um den Erfolg der Selektionen und der Präparationen („Rescue“) durch Helferphagen nachweisen zu können, mussten vor und nach dem Phagendisplay der Phagentiter bestimmt werden:

- 1. Runde: 1 µl Phagen aus Bibliothek (Input) sowie 1 µl Phagenüberstand aus selektionierter Lösung (Output) auf 1 µl verdünnte

Bakteriensuspension (in log-Phase des Wachstums (ab  $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$ ))  
geben

- 2. Runde und folgende: 1  $\mu\text{l}$  Phagen nach „Rescue“ (Input) sowie 1  $\mu\text{l}$  Phagenüberstand aus selektionierter Lösung (Output) auf 1  $\mu\text{l}$  verdünnte Bakteriensuspension (in log-Phase des Wachstums (ab  $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$ ))  
geben
- 30 min bei 37°C im Wasserbad
- 100  $\mu\text{l}$  der Suspension auf einer 2xTY-AG-Agarplatte ausgestrichen
- o/n, 30°C

Nur die Bakterien, die neben dem Fab-Gen auch die Ampicillinresistenz in sich tragen, können auf der Platte wachsen. Die wachsenden Kulturen werden als ‘colony forming units’ (cfu) ausgezählt.

Berechnung:

Phagentiter [*Anzahl an Phagen/ml*] =

$$(\text{Anzahl an Kolonien}) \times (1/\text{Verdünnung}) \times (1/\text{ausplattierte Menge}) \times 2$$

#### 4.4.2.2 Phagen-Amplifikation

5 ml E.coli-Bakterien in der log-Wachstumsphase wurden mit 1 ml der selektionierten Phagenlösung und mit 4 ml 2xTY-Medium versetzt. Dieser 10 ml Ansatz inkubierte 30 min bei 37°C im Wasserbad.

Mittels Zentrifugieren (4000g, 10 min) und Resuspension in 500  $\mu\text{l}$  2xTY-AG-Medium wurde die Lösung konzentriert. Nach jeder Selektionsrunde wurde die so gewonnene Zellsuspension auf zwei (1. Runde) bzw. eine (folgende Runden) 16  $\text{cm}^2$  große 2xTY-AG-Agarplatte/n ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank bebrütet und der Bakterienrasen am nächsten Tag mit 5 ml 2xTY-AG-Medium mithilfe eines sterilen Schabers abgelöst. Durch Zentrifugieren (4000g, 10 min) und Resuspension in 500  $\mu\text{l}$  2xTY-AG-Medium wurde die Lösung konzentriert. Das Konzentrat wurde in einen Nunc<sup>®</sup>-Cryotube überführt und mit sterilem Glycerin bis zu einer 15%-igen

Glycerinkonzentration verdünnt. Dieser Bakterienstock wurde bei -70°C gelagert. Nachfolgende Selektionsrunden können direkt aus der amplifizierten Phagenpopulation oder später aus dem eingefrorenen Stock durchgeführt werden.

#### 4.4.3 Präparation („Rescue“) der Phagen

In diesem Schritt vollzieht sich durch Koinfektion mit den Helferphagen die Produktion des Fusionsgens Fab/gIII-Hüllprotein und deren Expression auf der Phagenoberfläche.

- Koinfektion von 5 ml der resultierenden Zellsuspension aus 4.4.2.2 mit 1,5 µl Helferphagen M13K07
- 30 min bei 37°C im Wasserbad
- 10 min zentrifugieren mit 4000 g
- Bakterienpellet in 25 ml 2TY-AK resuspendieren
- o/n bei 270 U/min bei 30°C schütteln
- 20 min zentrifugieren mit 4000 g
- Überstand mit PEG/NaCl-Lösung (5:1) 1h auf Eis
- 15 min, 4000 g
- Pellet mit 1 ml PBS in 1,5-ml Eppendorf-Gefäß
- Reinigung von Bakterientrümmern: 2 min, 14000 g
- Pellet mit 200 µl PBS in 1,5-ml Eppendorf-Gefäß
- 15 min auf Eis
- 5 min, 14000 g

Die Phagen im Pellet können nach Resuspension in 500 µl PBS zum Panning benutzt werden oder mit Glycerol (Endkonzentration 15%) bei -70°C gelagert werden.

#### 4.4.4 Selektion zur Anreicherung antigenspezifischer Phagen

Um die Ausschöpfung der Diversität der Phagenbank zu gewährleisten, wurden die Mengen aus der Phagenbibliothek in 10-100fachem Überschuss eingesetzt. Aus der Phagemidbank wurden 500 µl zur Selektion abpipettiert, wobei 10 µl zur Analyse des Inputtiters gemäß 4.4.2.1 entnommen wurden. Mit dem verbliebenen Volumen aus der Phagenbibliothek wurde wie folgt vorgegangen:

- 490 µl aus Phagenbibliothek
- + Zugabe von 500 µl 4%-Milchpulver/PBS(MPBS), 60 min auf Laborrad
- + Zugabe von 13,7/4.66/1.83 µl des biotinylierten Antigens
- + 60 min auf Laufrad inkubieren

Während dieser Zeit wurden 600/300/100 µl (1./2./3. Runde) Streptavidin-Dynabeads vorbereitet:

- o mit 1 ml 2%-Milchpulver/PBS(MPBS), 2 h auf Laborrad
- o Magnetständer von Dynal zieht Streptavidin-Dynabeads an Gefäßrand
- o Überstand abpipettieren

Abweichend von der ersten Runde wurde, um Streptavidin-Binder aus dem Phagen-Repertoire zu entfernen, ab der zweiten Runde die Phagen-Lösung 30 min mit 100µl Streptavidin-Dynabeads präinkubiert, welche anschließend in einem magnetischen Feld (Magnetrack von Dynal) entfernt wurde. Der verbleibende Überstand wurde weiter verwendet. Die randständigen Dynabeads wurden mit dem Mix aus Phagen/biotinylietem Antigen resuspendiert und damit wie folgt weiter verfahren:

- ⊕ 15 min auf Laufrad inkubieren (der Phagen-Antigen-Komplex bindet an das freie Streptavidin der Dynabeads)
- ⊕ Dynabeats mit dem Magnetrack an Gefäßrand ziehen
- ⊕ Überstand vorsichtig abpipettieren

- ⊕ mit 2% MPBS/0,1% Tween20 waschen (*diesen und die 2 Schritte zuvor 6 mal wiederholen*)
- ⊕ Phagen-Antigen-Dynabeads-Komplexe in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß
- ⊕ obigen Waschvorgang 2 mal mit reinem PBS
- ⊕ Phagen-Antigen-Dynabeads-Komplexe durch pH-Shift 1ml Triethylamin (100mM) pH 12 eluieren
- ⊕ 10 min suspendieren
- ⊕ Streptavidin-Dynabeads mittels Magnetrack entfernen
- ⊕ Phagen in Lösung mit 500µl 1M Tris-HCL (pH=7,4) neutralisieren

Dieser Lösung wurden 10 µl entnommen, um den in 4.4.2.1 beschriebenen Outputtiter (Einheit: cfu) zu bestimmen. Ebenso konnten mit diesen Phagen nach Phagenamplifikation (siehe 4.4.2.2) in der jeweils nächsten Selektionsrunde die E.coli-Bakterien in der log-Wachstumsphase angeimpft werden.

Der Erfolg der Selektionen konnte am Phagentiter und der pro Runde erhöhten Anzahl der spezifischen Binder durch PCR der gepickten Kolonien und anschließendem Fingerprinting nach BstN-1-Verdau nachvollzogen werden.

#### 4.4.5 Produktion von einzelnen Phagen-Klonen

Die Phagenproduktion verläuft nahezu analog dem unter 4.4.3 beschriebenen „Phagen-Rescue“. Wurde dort ein Repertoire von Phagen generiert, so ist hier die quantitative Produktion von einzelnen Klonen das Ziel.

Nach Abschluss sowohl der 3. als auch der 4. Selektionsrunde und nach Phagentitration wurden jeweils 89 bzw. 90 Kolonien von den Outputtiter-Agarplatten gepickt und auf einer ELISA-Platte (96-Lochplatte) in jeweils 100µl 2xTY-AG-Medium inokuliert und wie folgt weiter verfahren:

- o/n, 30°C, 270 U/min in Schütteltruhe

- Zugabe von Glycerin zu einer Konzentration von 15%
- als Masterplatte bei -70°C einfrieren

Von der Masterplatte wurden jeweils 2µl mit einer Eppendorf®-Mehrkanalpipette in eine 96-Loch-Rundbodenplatte-Platte (Costar®) in 120µl 2xTY-AG-Medium pro Loch an-geimpft. Hierzu die weiteren Schritte:

- 37°C, 270 U/min in Schütteltruhe bis  $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$
- Zugabe pro Loch von 40µl 2xTY-AG-Medium, welches ca.  $2 \times 10^9$  Phagen/ml Helferphage M13K07 enthält
- 30 min, 30°C, 270 U/min in Schütteltruhe
- Platte 10 min bei 1700 U/min zentrifugieren
- Überstand möglichst komplett verwerfen, um vorhandenen, den LacZ Promotor supprimierende Glukose zu entfernen
- Pellets mit 120µl 2xTY-AK resuspendieren
- 14-18 h, 30°C, 270 U/min in Schütteltruhe
- 10 min, 1700 U/min zentrifugieren

Die Phagen mit den Antikörper-Fragmenten (Fabs) auf ihrer Oberfläche befanden sich nun im Überstand und konnten für die Bindungsanalysen auf das pp65-CMV-Antigen mittels ELISA und FACS eingesetzt werden.



#### 4.5 ELISA der selektionierten Phagen und produzierten Fab

[Engvall et al., 1971]

Im ELISA konnten die Fab-tragenden Phagen bzw. die löslichen Fab-Antikörperfragmente auf ihre Spezifität hin überprüft werden. Dazu wurden Nunc<sup>®</sup>-Maxisorb-Platten mit dem Antigen (*Peptidfolge NLVPMVATV (495-503) des Tegumentproteins pp65 des humanen Cytomegalievirus im MHC-Komplex*) beschichtet (*alle Angaben pro Loch*):

- 100 µl biotinyliertes BSA (Verdünnung 1:1000 in PBS)
- 1 h, 37°C
- 100 µl Streptavidin (Verdünnung 1:100 in PBS)
- 1 h, Raumtemperatur
- 1 µg/ml biotinylierte MHC-Peptid-Komplexe (gelöst in 100 µl PBS)
- o/n, 4°C

Zwischen jedem Beladungsschritt wurde zweimal mit PBS/Tween20 0,05% und einmal mit PBS gewaschen.

Das Aufbringen des biotinylierten BSA-Streptavidin-Spacers bewirkte, dass die MHC-Peptid-Komplexe ihre korrekte Faltung behalten. Bindet man die MHC-Peptid-Komplexe direkt an die Oberfläche der 96-Loch-Platte, kommt es zum Verlust der regelrechten biologisch wirksamen Konformation der MHC-Komplexe. Am folgenden Tag:

- 3 x waschen mit PBS
- mit 120 µl 2% MPBS die unspezifischen Bindungsstellen blocken
- 30 min, Raumtemperatur
- 2 x waschen mit PBS/Tween20 0,1% und 2 x mit PBS
- je 40 µl 4% MPBS und 40 µl des Überstandes antigen-bindungskompetente Fab-Phagen aus Kapitel 4.4.5 (alternativ lösliche 40 µg/ml Fabs aus Kapitel 4.7.2)
- 1 h, Raumtemperatur
- 5 x waschen mit PBS/Tween20 0,1% und 1 x mit PBS

- Positivkontrolle des Hybridom-Überstand Tü 155 und W6/32 auf je ein Loch
- für Phagen: 100 µl Anti-M 13 (1:3000fach verdünnt in 2% MPBS)
- für Fab: 100 µl Antikörper 9E10 (1:500fach verdünnt in 2% MPBS)
- 1 h, Raumtemperatur
- 5 x waschen mit PBS/Tween20 0,1% und 1 x mit PBS
- 100 µl HRP-Anti-Mouse-Antikörper (1:3000fach verdünnt in 2% MPBS)
- 1 h, Raumtemperatur
- 5 x waschen mit PBS/Tween20 0,1% und 1 x mit PBS

Mittels standardisierter Nutzung eines TMB-Peroxidase-Kits konnte im Falle von bindenden Fab-Phagen bzw. löslichen Fabs eine Farbreaktion ins Gelbe hervorgerufen werden. Die Quantifizierung der Gelbfärbung, die mit der Bindungsaffinität der gebundenen Fab-Phagen bzw. Fabs korreliert, konnte mit einem ELISA-Reader der Firma Wallac (Victor2, Multilabel Counter) bei 450 nm ausgemessen werden.

## 4.6 DNA Techniken

### 4.6.1 PCR

[Mullis et al., 1986]

Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) werden die selektionierten Klone in vitro exponentiell amplifiziert, um anschließend in einem DNA-Fingerprinting auf ihre Diversität hin überprüft werden zu können. Die PCR wurde in einem Eppendorf Mastercycler Gradient unter Verwendung von Taq-Polymerase durchgeführt.

Die Reaktionsansätze wurden, wie in Tabelle 5 gelistet, pipettiert. Die Ansätze wurden mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt.

**Tabelle 5: PCR-Ansätze**

PCR-Komponenten	Eingesetzte Volumina	Konzentration der Ausgangslösungen
Primer pUC Reverse	1 µl	10 µM
Primer fd-tet-seq24	1 µl	10 µM
dNTP-Mix	1 µl	5 mM/dNTP
Taq-10 x PCR-Puffer	2 µl	10 x
Taq-Polymerase	0,4 µl	5 U/µl
DNA-Template	0,7 - 1 µl	0,2-2 µg/µl

**Tabelle 6: PCR-Amplifikationsbedingungen**

10 min	94°C	Denaturierung	
45 s	94°C	Denaturierung	30 mal
45 s	50°C	Annealing	30 mal
1,5 min	68°C	Elongation	
10 min	68°C	Elongation	

Zur Analyse der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese wurde ein Gel mit 1,5%-Agaroseanteil verwendet.

#### 4.6.2 DNA-Fingerprinting

Mit dem Restriktionsenzym BstN-1 wurden die Produkte der PCR verdaut. Die einzelnen DNA-Fragmente ergeben durch Auftrennung in einem 3%-igen Agarosegel mittels Elektrophorese ein spezifisches Bandenmuster, den so genannten DNA-Fingerprint. Diese Methode wurde von Hoogenboom zur Validierung der aus dem Phagendisplay hervorgegangenen bindenden Antikörperfragmente entwickelt [Hoogenboom, Griffiths et al., 1991]. Die amplifizierte DNA wurde 2 h bei 60°C in folgendem Reaktionsgemisch verdaut:

NEB2-Puffer (10x konz.)	3,6 µl
Wasser	14,1 µl
BstN-1	0,3 µl.

Die durch das Restriktionsenzym zerschnittenen DNA-Fragmente wurden auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel aufgetrennt. Unterschiedliche Bandenmuster im Gel beweisen die Diversität der selektionierten Klone.

#### 4.6.3 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen wurden ausnahmslos in Auftrag gegeben. Auftragnehmer war das Institut für Immunologie und Genetik, Dr. Bernhard Thiele, in Kaiserslautern. Alle untersuchten DNA- und Proteinsequenzen wurden mit Hilfe der Internetanwendungen Chromas Lite ([http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)) und BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt.

#### 4.7 Produktion von löslichen Fab-Antikörpern

##### 4.7.1 Expression der löslichen Fab-Antikörper aus dem Periplasma

Mit Hilfe dieser Methode wurden Fab-Antikörper produziert, die bei weiteren Versuchen wie z.B. ELISA, Western Blot, FACS usw. eingesetzt werden können. Die Fab-Antikörper wurden hierfür aus dem Periplasma herausgelöst. Der Vorteil der Gewinnung aus dem Periplasma liegt darin, dass dort eine geringe Protease-Aktivität herrscht, weniger störende Proteine als im Zytoplasma oder im Überstand vorkommen und der zu gewinnende Antikörper in einer höheren Konzentration existiert.

Bakterienkulturen, die Antikörper-kodierenden Plasmide eingeschlossen, kultiviert in 2xTY-AG-Medium mit wenig Glucose und mit Isopropylthio- $\beta$ -galactosid (IPTG), produzierten lösliche Fab-Antikörper und transportieren diese ins Periplasma. Dort wurden sie über vier Stunden hinweg aufkonzentriert. Im Periplasma wurde dabei die Signalsequenz, welche den Transport der Proteine veranlasst hat, abgetrennt und der Fab-Antikörper wurde durch korrekte Faltung und das Ausbilden von Disulfidbrücken voll funktionsfähig.

Zur Gewinnung der Fab-Antikörper wurden TG1-Zellen, welche das Antikörper-kodierende Plasmid enthalten, zuerst in 50 ml 2xTY-AG-Medium inokuliert. Anschließend wurde folgendermaßen mit der Lösung verfahren:

- o/n, 30°C, 255 U/min

- Entnahme von 8 ml und Zugabe von 800 ml 2xTY-A(0,1%) Glucose-Medium
- Anzucht bis OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8
- Hinzugabe von 800 µl 1mM IPTG-Lösung
- 4 h, 255 U/min, 30°C
- 15 min, 4000 U/min, 4°C in 500 ml Abdrehgefäßen
- 12 h, -20°C um die Bakterienwand zu permeabilisieren.
- Resuspension des Pellets in 10ml eiskaltem PBS(pH=8)/EDTA-free Proteinaseinhibitor und Auswaschen der Gefäße mit weiteren 10 ml
- Überführung der 20 ml Bakterien-/Peptidlösung in ein 50 ml Falcon®
- o/n, 4°C auf ein Rollbrett zum Herauslösen der Fab-Antikörper
- 20 min, 8000 U/min, 4°C

Die Peptide befanden sich danach im Überstand und konnten nun über einen weiteren Schritt aufgereinigt werden.

#### 4.7.2 Reinigung der löslichen Fab-Antikörper

Im Plasmid befindet sich am 5' Ende der den Fab-Antikörper kodierenden Gensequenz eine 6x Histidin-Folge (his-tag) kodierende Sequenz. Dieses his-tag dient bei der Reinigung der Fab-Peptide als Bindungsanker für Talon®-Resins. Die Talon®-Resins enthalten Co<sup>2+</sup> - Ionen, an die die freien N-Atome des Histidin binden [Chaga GS et al., 1999; BD Biosciences Produktkatalog].

Für die Reinigung benötigt man pro 800 ml-Bakterienkultur 1 ml homogene Talon®-Lösung. Die Talon®-Resins werden in einem Falcon mit 50 ml PBS(pH=8) einmal gewaschen. Zum Sammeln dreht man sie dann bei 1200 U/min für drei Minuten ab. Auf dieses Talon®-Pellet gibt man den in Kapitel 4.7.1 gewonnen Überstand und lässt dies nun für eine Stunde bei 4°C auf dem Rollbrett inkubieren. Nun kommt es zur Bindung des Proteins über das Histidin-Tags an die Talon®-Resins. Nach der Inkubation dreht man die Proteingekoppelten Talon®-Resins für drei Minuten bei 1200 U/min ab. Der Überstand wird nun vorsichtig, ohne die Talon®-Resins aufzuwirbeln, abpipettiert und

verworfen. Es folgt ein Waschschrift, bei dem die Talon<sup>®</sup>-Resins mit 50ml PBS(pH=8)/Tween20 0,1% für 10 Minuten bei 4°C auf dem Rollbrett gewaschen wird. Nach einem dreiminütigen Abdrehen bei 1200 U/min werden die Talon<sup>®</sup>-Resins in eine verschlossene Biorad-Schwerkraftsäule überführt. Die Säule wird mit PBS(pH=8)/Tween20 0,1% aufgefüllt und man wartet nun bis sich die Talon<sup>®</sup>-Resins auf dem Sieb gesammelt haben. Danach öffnet man die Verschlusskappe der Säule und lässt die Waschlösung langsam an den Resins vorbeilaufen. Diesen Waschvorgang wiederholt man insgesamt dreimal. Um die gebundenen Proteine zu eluieren gibt man pro 1ml Talon<sup>®</sup>-Resins 1,5 ml 100mM-Imidazol-Lösung auf die Säulen. Das Imidazol verdrängt dabei das Histidin aus der Bindung zum Co<sup>2+</sup> aufgrund der höheren Affinität. Dies kann man auch anhand eines Farbwechsels der Talon<sup>®</sup>-Resins erkennen, welche ihre Farbe von einem eher farblosen zarten Hellrot zu intensiv Violett ändern. Die so eluierte Fraktion wurde dann über Nacht bei 4°C in 5 l PBS dialysiert, um das enthaltene Imidazol auszuwaschen.

Um die Reinheit der Peptide zu kontrollieren, wurden diese mittels SDS-PAGE (10%) getrennt und anschließend einer Coomassie-Färbung unterzogen.

#### 4.7.3 Auftrennung in der SDS-PAGE

**Tabelle 7: Zusammensetzung der SDS-Gele**

<b>Gelkomponenten</b>	<b>Trenngel (12%)</b>	<b>Sammelgel (5%)</b>
H <sub>2</sub> O	1,7 ml	1,4 ml
Acrylamidmix (29,2 % Acrylamid und 0,8 % N,N'-Methylen-bis-Acrylamid)	2 ml	0,33 ml
1,5M Tris (pH=8,8)	1,3 ml	/
1,0M Tris (pH=6,8)	/	0,25 ml
SDS (10%)	0,05 ml	0,02 ml
APS (10%)	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml

SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld [Laemmli, 1970]. Voraussetzung sind dabei Bedingungen unter denen die Dissoziation der Proteine in die einzelnen Polypeptide und Linearisierung gewährleistet ist. Nach Hitzedenaturierung und Verwendung reduzierender Agenzien binden die denaturierten Polypeptide das stark anionische Detergenz SDS und werden so negativ geladen. Weil die Menge des gebundenen SDS proportional zum Molekulargewicht des entsprechenden Polypeptids ist [Shapiro et al., 1967], wandern die SDS-Polypeptid-Komplexe bei der Elektrophorese nun in Abhängigkeit von der Größe des Polypeptids unterschiedlich weit im Polyacrylamidgel, so dass eine Auftrennung der unterschiedlichen Polypeptide möglich ist. Die Verwendung von Zwei-Phasen-Gelen, mit Konzentrierung und Ausrichtung aller SDS-Polypeptidkomplexe in einem möglichst kleinen Volumen in einem oberen Gelabschnitt („stacking gel“) und Auftrennung dann im unteren Gelabschnitt, erhöht dabei die Auflösung der Gele [King et Laemmli, 1971].

Zur Durchführung werden nach Standardprotokollen SDS-Polyacrylamidgele gegossen, mit gleichen Mengen der denaturierten Proteine (3 min/100°C) geladen und die Elektrophorese unter Verwendung eines Tris-Laufpuffers (Laemmli-Puffer) praktiziert.

#### 4.7.4 Coomassie-Färbung

Die Proteine können in den SDS-PAGE-Gelen durch Anfärben mit Coomassie sichtbar gemacht werden. Dazu werden die Gele 30 min lang in Coomassiefärbelösung geschwenkt. Dabei wurden die aufgetrennten Proteine gleichzeitig mit Methanol und Essigsäure fixiert und mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Zum Entfärben wurden die Gele mehrfach in Wasser gewaschen, über Nacht in Entfärbelösung auf einem Kipptisch geschwenkt und wiederum mehrfach mit Wasser gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren.



## 4.8 Oberflächenfärbung von Zellen und Durchflusscytometrie (FACS)

### 4.8.1 Oberflächenfärbung von Zellen

T2-Zellen fehlen die Gene für den TAP1 und TAP2-Transporter. Wegen dieser TAP-Transporter-Defizienz können über den intrazellulären Beladungsweg keine MHC-I-Komplexe mit Peptid beladen werden. Da die Zellen jedoch unbeladene MHC-I-HLA2-Komplexe auf der Oberfläche exprimieren, kann mit exogenem Peptid ein stabiler Komplex realisiert werden.

Für die Färbung peptidgepulster T2-Zellen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 1ml FCS-freiem RPMI-Medium aufgenommen und einmal gewaschen. Danach wurden sie in jeweils 1 ml FCS-freiem RPMI-Medium, in welchem zuvor die entsprechenden Beladungspeptide mit einer Endkonzentration von 20 µg/ml gelöst worden waren, aufgenommen, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und dann für 2 Stunden in einen Inkubator (37°C und 5%igen-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre) gestellt. Die zu beladenden Peptide lagen gelöst in DMSO vor. Um möglichst wenig DMSO zu übertragen, erfolgte die Peptidzugabe in die Zellsuspension über einen Vortexer.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen bei 1800 U/min für 4 Minuten abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen, mit 1 ml PBS/2%FCS und Zentrifugieren bei 1600 U/min für 5 min wurden die Zellen im nächsten Schritt in 100 µl PBS/2%FCS, in dem der primäre Fab-Antikörper gelöst war, resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert.

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgten wiederum ein Wasch- und ein Zentrifugationsschritt, um eventuell ungebundene Antikörper abzuwaschen. Anschließend wurde der erste Sekundärantikörper hinzugegeben. Handelt es sich bei dem Primärantikörper um einen infektiösen Phagen, der Fab-Antikörper präsentiert, wurde als sekundäres Reagens Maus-anti-M13-Antikörper in der Konzentration 1:100 verwandt. Im Falle eines löslichen Fab-Antikörpers, wurde als sekundäres Reagens Maus-anti-c-myc 9E10 (1:100) verwendet. Entwickelt wurde über anti-Maus-Biotin (1:200) und Streptavidin-PE (1:200). Hierbei wird ebenfalls bei jedem Schritt mit 1 ml PBS/2%FCS gewaschen.

Die Färbung der Kontrollen W6/32 und anti-HLA-A2-Antikörper BB7.2 [Parham & Brodsky, 1981] erfolgt analog den beiden oben genannten Methoden. Der sekundäre Antikörper ist in diesem Fall ebenfalls anti-Maus-Biotin in der Konzentration 1:200.

Nach dem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen zur durchflusszytometrischen Analyse in reinem PBS aufgenommen. Die FACS-Analysen erfolgten in einem Becton Dickinson™ FACScan® nach den Vorgaben des Herstellers [Radbruch A, 1989]. Die Datenerfassung erfolgte mit Hilfe der Cellquest Software (Becton Dickinson). Es wurden jeweils 20.000 Zellen erfaßt, wobei Forward Scatter linear und Side-Scatter sowie Fluoreszenzdaten logarithmisch registriert wurden. Die Daten wurden mit WinMDI 2.8 und bearbeitet.

#### 4.8.2 Durchflusscytometrie (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können physikalische und biochemische Eigenschaften von Zellen auf der Grundlage von Emission und Lichtbrechung untersucht werden.

Hierfür wird eine Zellsuspension in die partikelfreie schnellfließende Trägerflüssigkeit eines Durchflusszytometers gebracht. Hydrodynamisch fokussiert, fließen die Zellen einzeln durch einen scharf gebündelten Laserstrahl. Jede Zelle erzeugt Signale, indem sie Licht streut und Fluoreszenz emittiert. Die Strahlung wird über Linsen, Spiegel und Filter auf Photodetektoren geleitet und verstärkt. Der *forward scatter* (FSC) erfasst Licht, das im 180 °C Winkel durchgelassen wird und misst damit die Größe der Partikel. Durch Detektion der seitlichen Streuung im *side scatter* (SSC) wird die Granularität bestimmt. Sind die Zellen mit Fluoreszenzmolekülen verbunden, werden diese durch den Laserstrahl (Argonlaser,  $\lambda=488$  nm) angeregt und geben die absorbierte Energie in Form von Licht höherer Wellenlänge wieder ab. Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) haben ein ähnliches Absorptionsspektrum, können aber durch die unterschiedlichen Maxima ihrer Emissionswellenlängen [Emmax (FITC)=520 nm, Emmax (PE)=575 nm]

separat erfasst werden. Dies ermöglicht die Messung von zwei weiteren Parametern, der Grün- und Rotfluoreszenz. In der vorliegenden Arbeit wird die Durchflusszytometrie häufig als FACS abgekürzt. FACS steht für „fluorescence-associated cell sorting“.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Selektion rekombinanter Fab-Antikörper gegen den Komplex HLA-A2/CMV-pp65<sub>495-503</sub>

Es wurden 4 Selektionsrunden aus der mit Fab-Antikörpern besetzten M13-Phagenbibliothek gegen den pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201-Komplex als Antigen durchgeführt. Die Konzentration des Antigens wurde zu Gunsten der Selektion von Bindern mit höherer Affinität bei ansteigender Rundenzahl wie folgt reduziert: 300 nM / 100 nM / 20 nM / 20 nM.

Der Erfolg der Selektionen kann in Tabelle 8 an der Titer-Entwicklung und der Anreicherung abgelesen werden.

**Tabelle 8: Anreicherung der pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201-spezifischen Phagen**

	<b>Eingangstiter</b> (cfu)	<b>Ausgangstiter</b> (cfu)	<b>Verhältnis</b> <b>Ausgangstiter</b> <b>/</b> <b>Eingangstiter</b>	<b>Anreicherung</b>
1. Runde	4.1 10 <sup>11</sup>	6 10 <sup>5</sup>	1.46 10 <sup>-06</sup>	
2. Runde	2.4 10 <sup>11</sup>	5.4 10 <sup>6</sup>	2.3 10 <sup>-05</sup>	15,75
3. Runde	1.2 10 <sup>13</sup>	5 10 <sup>8</sup>	4.1 10 <sup>-05</sup>	28,08
4. Runde	6.6 10 <sup>12</sup>	1.1 10 <sup>9</sup>	1.6 10 <sup>-04</sup>	109,59

Nach jeder Selektionsrunde wurden gemäß Methodenbeschreibung (siehe 4.4.2.1 und 4.4.2.2) die Phagen mittels 3-Ösen-Ausstreichung titriert und amplifiziert.

## 5.2 ELISA mit Fab-Phagen zur Spezifitätstestung

Panspezifität im Bindungsverhalten bedeutet, dass der Fab-Phage zwar am MHC-Komplex bindet, jedoch nicht in der in unserer Untersuchung beabsichtigten Peptid-spezifischen Interaktion.

**Tabelle 9: Bindungsquoten (spezifisch, un-/panspezifisch, nichtbindend) nach den einzelnen Selektionsrunden**

	MHC-Peptid-spezifische Binder	panspezifische MHC-Binder	„Nicht-Binder“	Negativkontrolle
1. Runde				1
2. Runde	2 / 32	5 / 32	25 / 32	0
3. Runde	3 / 57	4 / 57	50 / 57	0
4. Runde	34 / 90	47 / 90	9 / 90	32

Aus dem Repertoire der 2., 3. und 4. Runde wurden zufällige Kolonien gepickt und in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte angeimpft. Tabelle 9 zeigt die Zahlen der angeimpften Kolonien. Von der 2. Runde wurden 32 Löcher einer 96-Loch-Mikrotiterplatte und von der 3. Runde 57 Löcher angeimpft. Aus den Bakterien wurden Fab-Phagen gemäß 4.4.5 produziert und mit diesen insgesamt 89 Fab-Phagen ein ELISA durchgeführt, dessen Ergebnis ebenfalls in Tabelle 9 ersichtlich ist. Lediglich 5 spezifische (Fab-Phagen erkennen ausschließlich pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201-Komplex) und 9 unspezifische Binder (Fab-Phagen erkennen auch HLA-NY-ESO-1-Kontrollkomplex) zeigten Bindungsverhalten auf die angebotenen MHC-Peptid-Komplexe. 75 Fab-Phagen erwiesen sich als „Nicht-Binder“.

Nach drei Selektionsrunden band die Mehrheit der untersuchten Klone (50/57) nicht das verwendete Antigen. Deshalb führten wir eine 4. Selektionsrunde durch, um die Phagen mit Affinität zum Antigen anzureichern. Nach Beendigung der 4. Runde konnten 34 spezifische Binder gezählt werden.

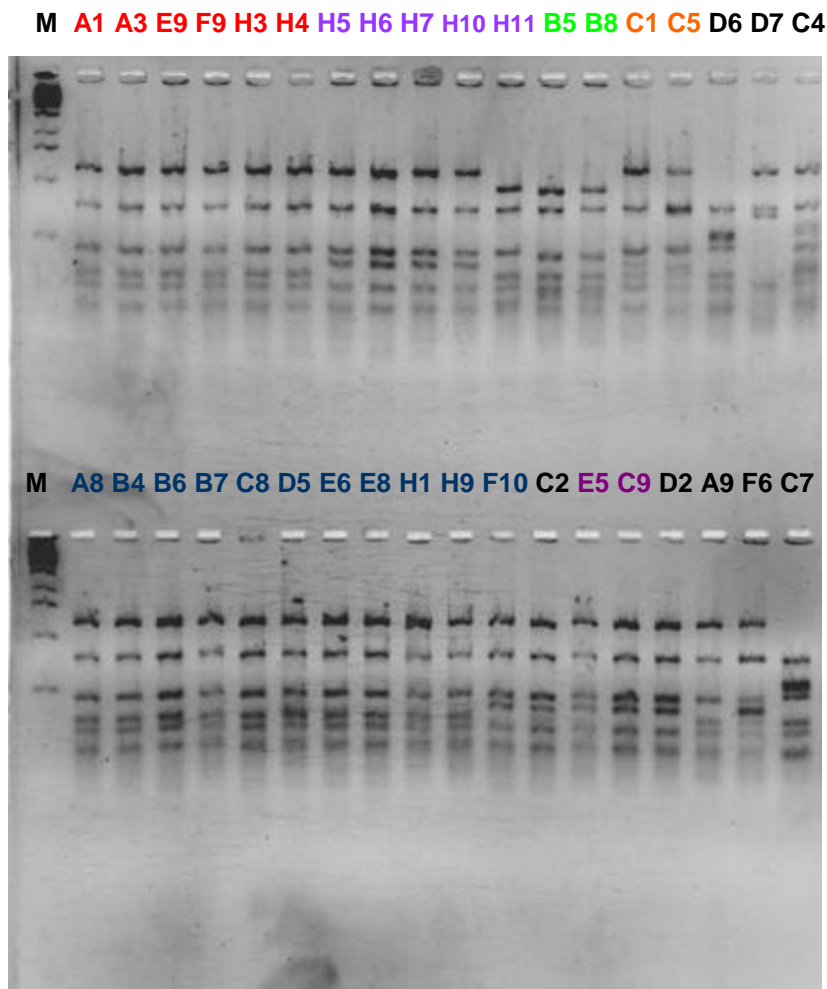
Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse des ELISA nach der 4. Selektionsrunde. Neben diesen 34 MHC-Peptid-spezifischen Bindern an das CMV-Peptidfragment wurden zur weiteren Analyse (PCR-Fingerprinting, FACS) auch die 3 stärksten pan-MHC-spezifischen Binder (A1, A3 und C4) mitgeführt. Die Effizienz der 4. Runde spiegelt sich auch in dem hohen Verhältnis von Bindern zu „Nicht-Bindern“ wider. In Tabelle 10 sind die MHC-Peptid-spezifischen Binder grün, die pan-MHC-spezifischen Binder braun und die „Nicht-Binder“ gelb hinterlegt. Die Unterscheidung, ob MHC-Peptid-spezifisch bzw. pan-MHC-spezifisch bindend oder nicht bindend, wurde davon abhängig gemacht, ob das jeweilige ELISA-Signal über dem dreifachen Hintergrund von 0,243 (Mittel aus den Felder A7, F12, G12 und H12 der beiden Platten) lag. D12 und E12 stellen jeweils die Positivkontrollen dar.

**Tabelle 10: ELISA mit Fab-Phagen nach der 4. Selektionsrunde** (grün: spezifisch bindend an MHC-CMV/pp65<sub>495-503</sub>-Komplex; braun: an Kontrollpeptid im MHC-Komplex bindend; gelb: nicht bindend). D12: Positivkontrolle Tü 155. E12: Positivkontrolle W6/32. A7, F12, G12 und H12: Negativkontrollen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,176	1,383	2,149	1,781	1,421	0,638	0,057	1,254	1,055	1,334	2,009	1,781
B	0,077	1,839	1,681	1,846	1,602	1,122	1,236	1,012	0,953	1,562	1,020	1,730
C	1,911	2,030	0,151	2,043	1,865	0,053	1,136	1,322	1,408	0,973	0,083	1,969
D	1,875	1,011	1,297	1,432	1,857	1,593	1,340	1,496	1,605	0,047	1,464	1,385
E	2,229	1,806	1,251	1,803	1,481	1,418	1,725	0,962	1,138	1,455	1,375	1,604
F	0,056	1,852	1,870	1,367	1,496	0,887	0,865	0,189	1,125	0,993	1,209	0,089
G	1,807	1,650	1,453	1,955	1,426	0,848	0,445	0,054	0,910	0,082	1,826	0,160
H	1,777	1,736	1,735	2,220	1,425	1,308	1,343	1,050	1,253	0,952	1,971	0,049
<b>96-Lochplatte, Antigen: pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A*0201-Komplex</b>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,639	0,554	0,645	0,229	0,942	0,456	0,051	0,182	0,62	0,324	0,767	0,871
B	0,058	1,422	1,109	0,449	0,254	0,224	0,204	0,211	0,820	1,183	0,433	0,884
C	0,281	0,16	0,066	0,449	0,067	0,067	0,178	0,203	0,257	0,887	0,078	1,259
D	1,372	0,16	1,223	0,879	0,191	0,313	0,179	0,411	0,714	0,057	1,684	1,853
E	1,102	0,714	1,014	1,356	0,157	0,211	1,999	0,202	0,300	0,874	0,941	1,954
F	0,257	0,430	0,874	0,388	1,199	0,060	1,187	0,143	0,191	0,168	1,534	0,098
G	1,309	1,224	1,172	0,912	0,628	0,903	0,429	0,078	0,353	0,100	1,264	0,075
H	0,490	0,255	0,175	0,179	0,145	0,131	0,188	1,151	0,155	0,114	0,060	0,068
<b>96-Lochplatte, Antigen: NY-ESO-1<sub>157-165</sub>/HLA-A*0201-Komplex</b>												

### 5.3 PCR und DNA-Fingerprint der 37 Fab-Phagen

Um die Verschiedenheit der 37 gefundenen Klone zu testen, wurden alle Klone mittels PCR amplifiziert, mittels Enzymverdau gestückelt und auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Nach mehreren Durchgängen konnte die Anordnung auf dem Gel so gewählt werden, dass Bandenmuster gleicher Struktur nebeneinander platziert waren (Abbildung 4). Solch gleiche Muster zeugen davon, dass die Klone identisch sind, d.h. den identischen Fab-Antikörper kodieren. Aus den Gleichen wurde je ein oder zwei Vertreter für die nachfolgenden weiteren Testungen ausgewählt.



**Abbildung 4: DNA-Fingerprinting der Fab-Phagen** (aus den gleichfarbigen Klonen wurde jeweils ein oder zwei Vertreter weiter untersucht)

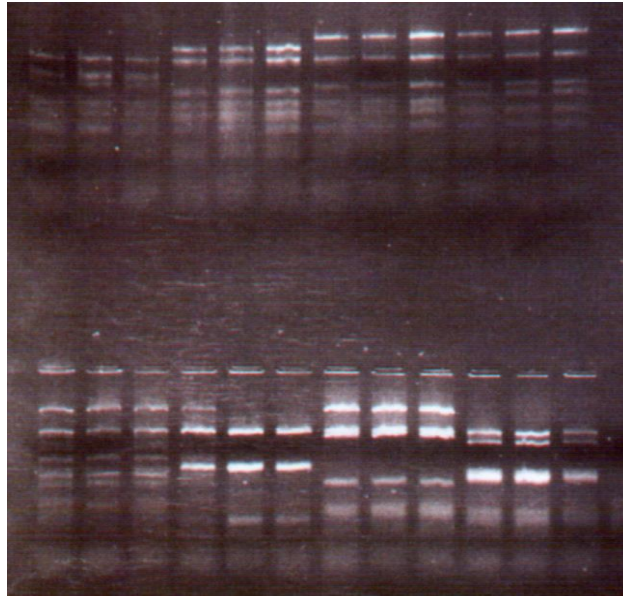


Im Einzelnen wurden folgende 14 Klone weiterführend untersucht:

<b>A9</b>	<b>F6</b>
<b>C2</b>	<b>F10</b>
<b>C4</b>	<b>C5</b> ( <i>für C1</i> )
<b>C7</b>	<b>C9</b> ( <i>für E5</i> )
<b>D2</b>	<b>H4</b> ( <i>für A1, A3, E9, F9, H3</i> )
<b>D6</b>	<b>H9</b> ( <i>für A8, B4, B6, B7, C8, D5, E6, H1</i> )
<b>D7</b>	<b>H11</b> ( <i>für B5 u. B8</i> )

#### 5.4 Testung auf Monoklonalität

Da die Klone von einer Agarplatte gepickt worden sind, die von einem polyklonalem Repertoire bewachsen war, bestand theoretisch die Möglichkeit, dass die Kultur mit anderen Klonen kontaminiert war. Um die sichere Gewähr einer monoklonalen Kultur zu haben, wurden die Klone dreifach wiederholt mittels 3-Ösen-Ausstrich auf Agarplatten angezüchtet. Aus jeder Anzucht wurde eine eindeutig isoliert wachsende Kolonie gepickt und als Tripletts auf dem Agarosegel nebeneinander aufgetragen und verglichen. Alle Klone erwiesen sich als monoklonal. Abbildung 5 zeigt beispielhaft (von links oben nach rechts unten) für die Klone A9, C2, C4, C5, C7, D7, F6 und H11 die jeweiligen Tripletts, die die Monoklonalität belegen.



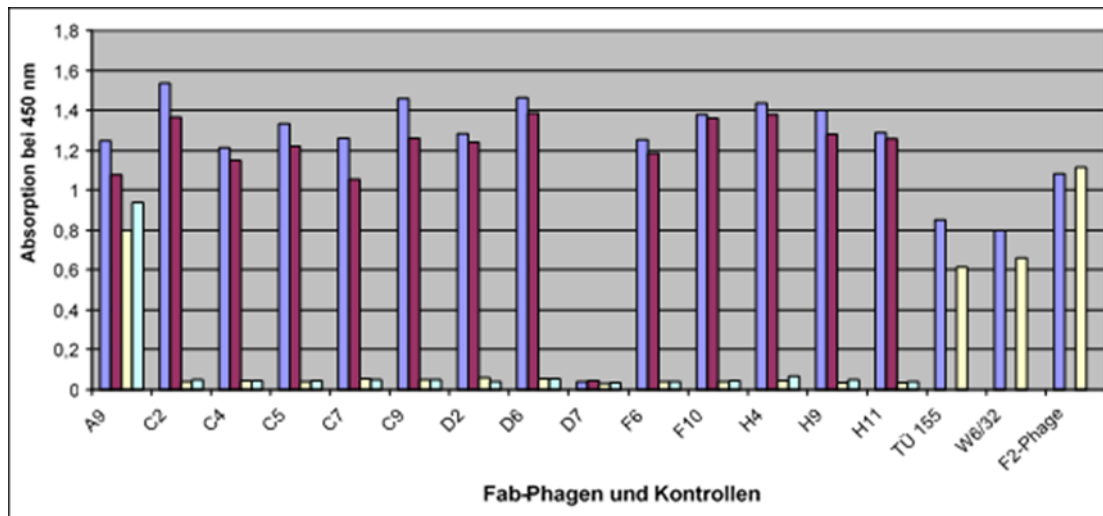
**Abbildung 5: Testung auf Monoklonalität**

### 5.5 ELISA mit Fab-Phagen zur erweiterten Spezifitätstestung

Die 14 diversen Klone wurden einer weiteren ELISA-Analyse gegen das Kontrollpeptid SSX-2<sub>41-49</sub> im HLA-A\*0201-Komplex unterzogen.

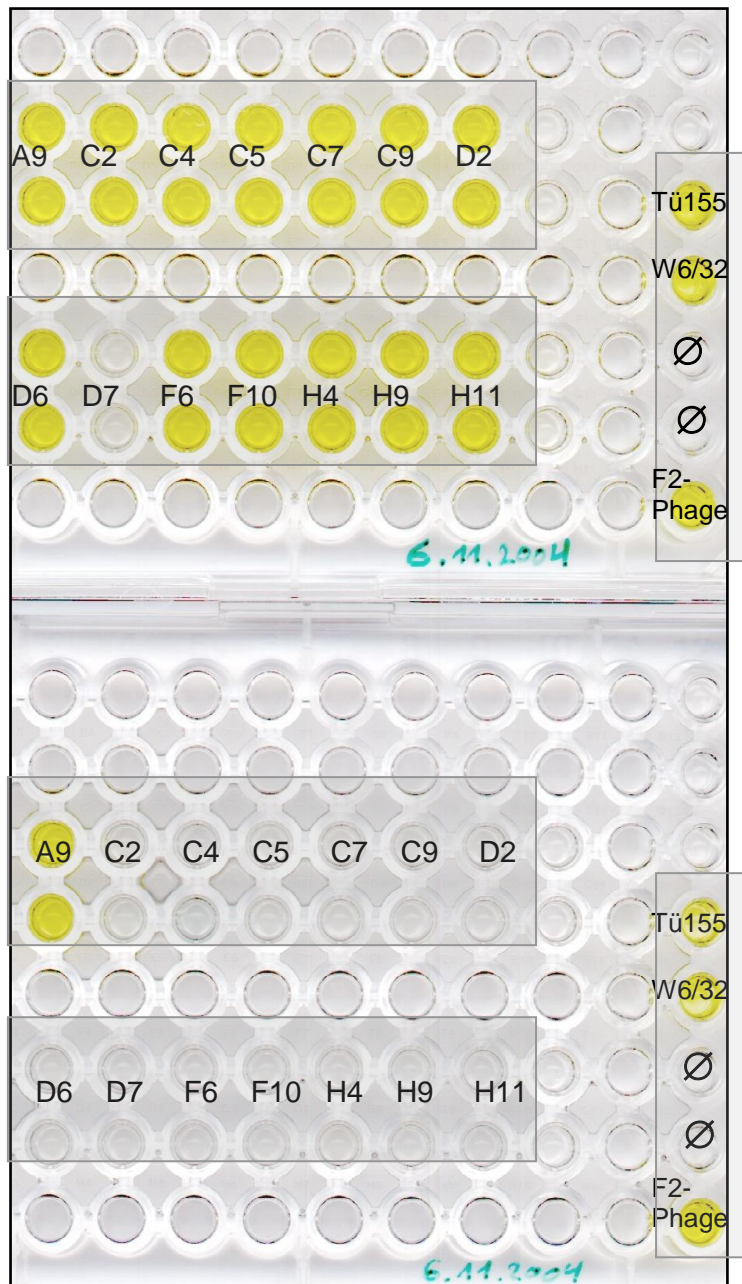
Folgende Zuordnungen zu den verwendeten MHC-Peptidkomplexen gelten:

1. Messwert pp65395-403/HLA-A\*0201-Komplex (blau)
2. Messwert pp65395-403/HLA-A\*0201-Komplex (lila)
1. Messwert SSX-241-49/HLA-A\*0201-Komplex (gelb)
2. Messwert SSX-241-49/HLA-A\*0201-Komplex (grün)



**Abbildung 6: ELISA mit Fab-Phagen gegen den MHC-pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201-Komplex und das Kontrollpeptid MHC-SSX-2<sub>41-49</sub>/HLA-A\*0201-Komplex**

Abbildung 6 zeigt, dass die Klone A9 (kreuzreaktiv auf SSX-2<sub>41-49</sub>/HLA-A\*0201-Komplex) und D7 (keine Bindungsaffinität) aus der weiteren Betrachtung herausfallen. Abbildung 7 verdeutlicht optisch die Ergebnisse der getesteten Klone sowie die verwendeten Positivkontrollen (Tü155, W6/32 und F2-Phage) und Negativkontrollen  $\emptyset$  (F12 und G12).



**Abbildung 7: ELISA mit Fab-Phagen** (Originalversuchsplatten zu Versuchsanordnung gemäß Abbildung 6)

## 5.6 Produktion von Fab-Antikörpern

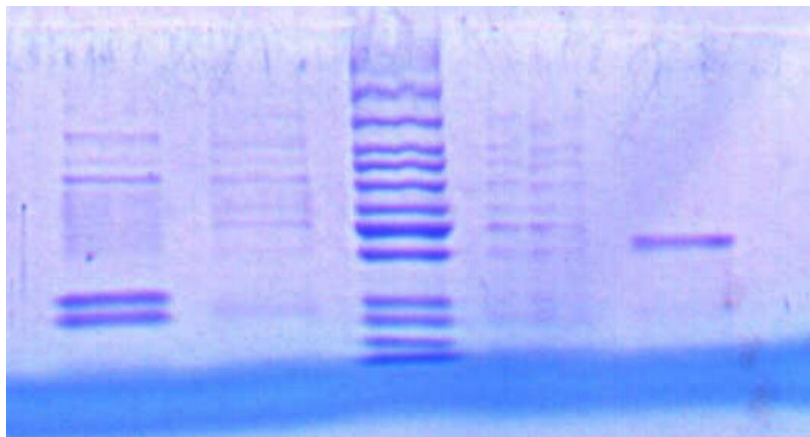
Nach den Phagen-ELISA verblieben 12 Klone, die keine Kreuzreaktivitäten gegen die verwendeten Kontrollpeptide aufwiesen. Im nächsten Schritt wurden nun gemäß Kapitel 4.7 rekombinante, lösliche Fab-Antikörper produziert. Dafür wurden die 6 Klone mit der stärksten Signalintensität aus den Phagen-ELISA ausgewählt: **C2, C4, C5, C7, F6 und H11**.

Abbildung 8 zeigt beispielhaft an Klon H11 die Fab-Antikörper auf einem SDS-Gel jeweils mit einem nicht-reduzierenden und einem reduzierenden Ladepuffer. Die 50 kDa-Bande in der nicht-reduzierten Form repräsentiert den Fab und die beiden 20- bzw. 30 kDa-Banden stehen für die leichte und schwere Kette nach Spaltung der Disulfidbrücken in reduzierendem Ladepuffer. Die Auftragung auf ein SDS-Gel dient der Reinheitskontrolle der Fab-Antikörper.

20 u. 30 kDa

Marker

50 kDa

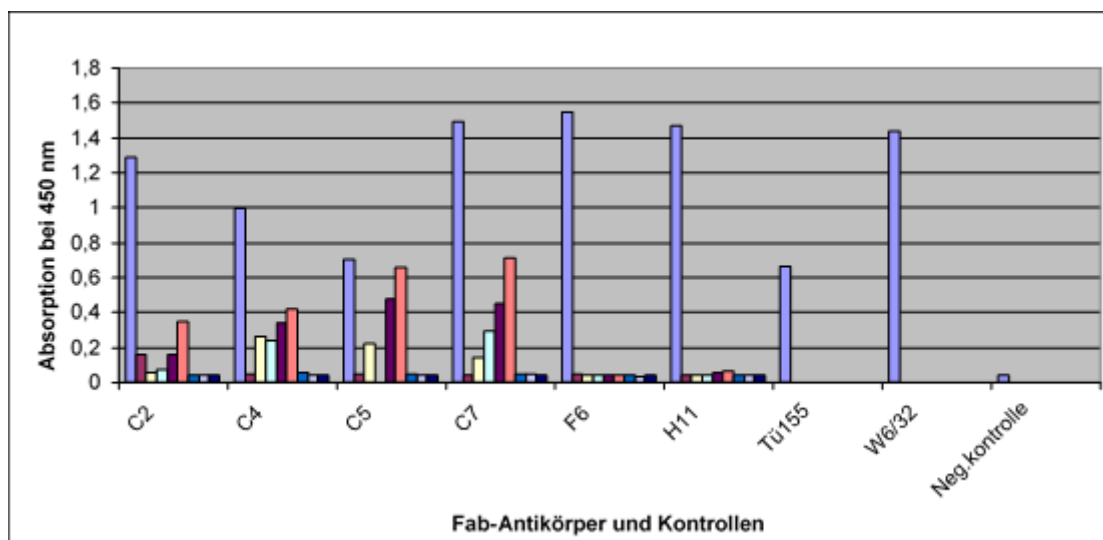


**Abbildung 8: Auftragung des Fab H11 auf ein SDS-Gel** (links: der Fab unter reduzierenden Bedingungen in schwere und leichte Kette gespalten); PageRuler™ Unstained Protein Ladder: 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120, 150, 200 kDa (von unten nach oben)

## 5.7 Fab-ELISA

Die ELISA-Ergebnisse der 6 produzierten löslichen Fab-Antikörper sind in Abbildung 9 ersichtlich. Als Antigen wurde ein erweitertes Panel an

rekombinanten MHC-Peptid Komplexen verwendet, welche folgende Peptide präsentieren: getestet gegen die Kontrollpeptide IMP<sub>58-66</sub>, HLS<sub>254-262</sub>, GLL<sub>421-429</sub>, LLS<sub>26-35</sub>, GLA<sub>271-279</sub>, SSX-2<sub>41-49</sub>, SSX-2<sub>103-111</sub> (mit der HLA-A\*0201 Schwerkette gefaltet) und Flu (mit HLA-A\*0301 Schwerkette gefaltet). Lediglich die Klone F6 und H11 weisen ein spezifisches Bindungsverhalten gegen den pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201-Komplex auf. Die anderen Klone reagieren teils mit den verwendeten Kontrollpeptiden, v.a. mit GLA. Die Signalstärken von F6 und H1 liegen ca. zwölfmal über dem dreifachen Hintergrundsignal.

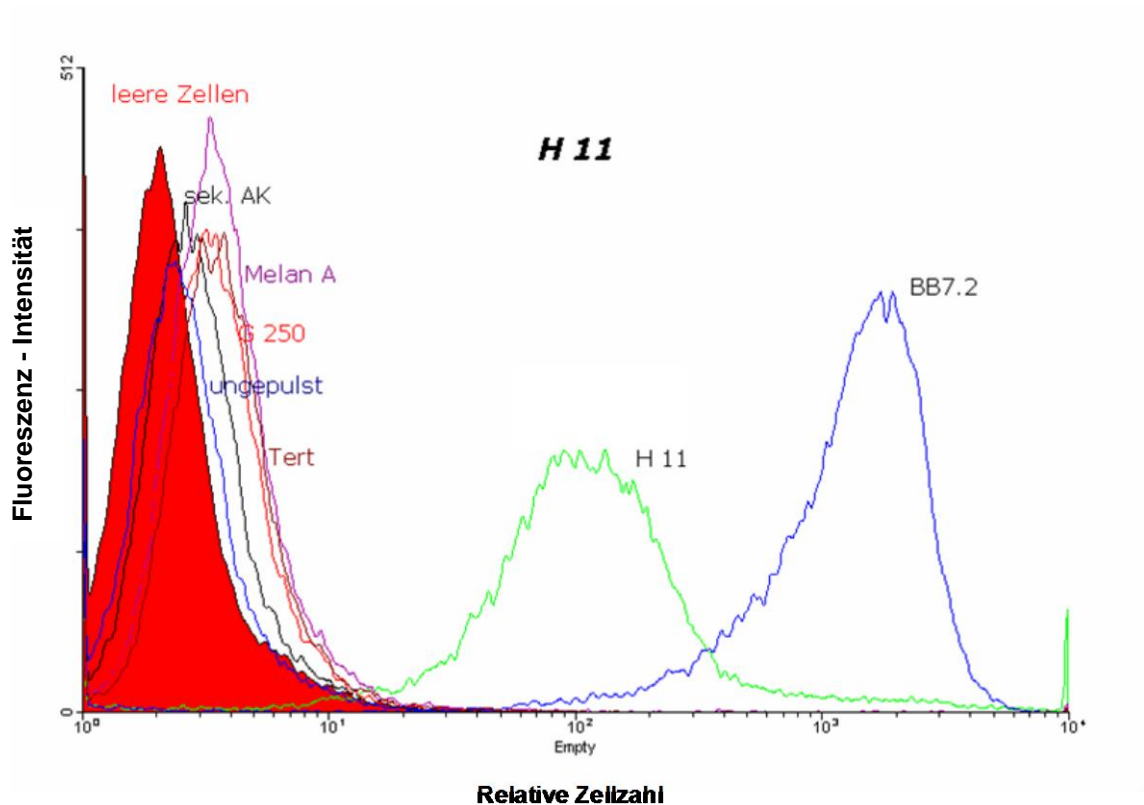


**Abbildung 9: ELISA mit löslichen Fab-Antikörpern.** Als Antigen wurden die Kontrollpeptide bIMP, HLS, GLL, LLS, GLA, SSX-241-49, SSX-2103-111- und Flu verwendet. Die Farbzuordnungen in Abbildung 9 sind folgendermaßen: CMV-pp65 (hellblau), bIMP58-66 (lila), HLS254-262 (gelb), GLL421-429 (hellgrün), LLS26-35 (dunkellila), GLA271-279 (rosa), SSX-241-49 (blaugrün), SSX-2103-111- (grau) und Flu (blau).

### 5.8 FACS-Analysen mit peptidgepulsten Zellen

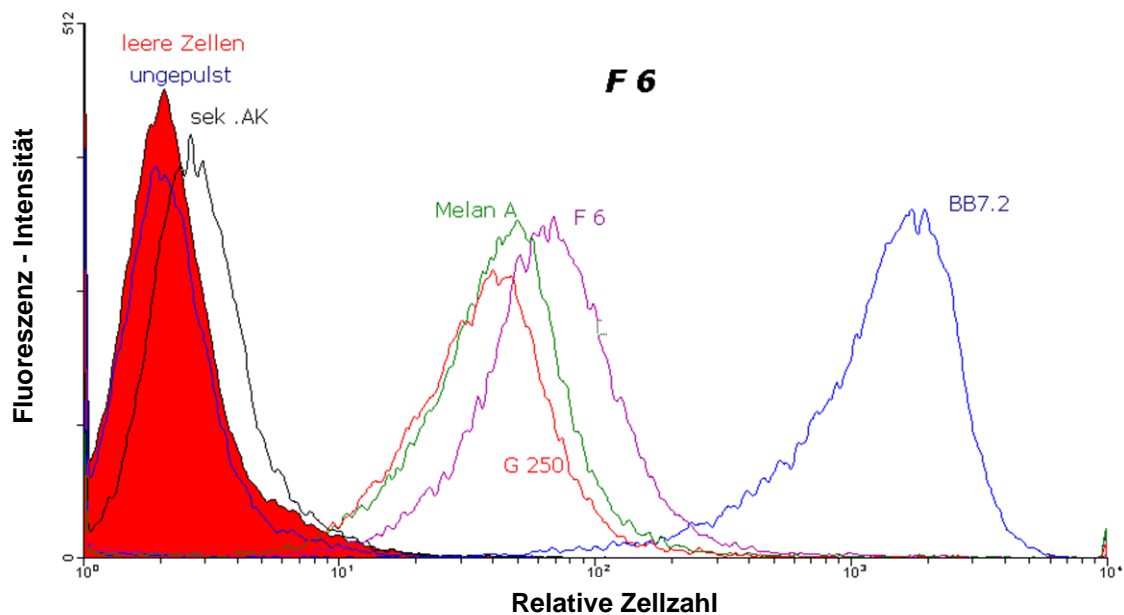
Waren in den ELISA-Untersuchungen die Peptid-präsentierenden MHC-Komplexe auf Nunc<sup>®</sup>-Maxisorb-Platten beschichtet, so galt es in den FACS-Untersuchungen zu zeigen, dass die Fab-Antikörper mit den antigenbehafteten MHC-Peptid-Komplexen auch in ihrer nativen, auf der Oberfläche von Zellen präsentierten, Form interagieren. Hierzu wurden Zellsysteme verwendet, bei denen das Peptid von extern beladen wurde. Dabei wurden die Zellen mit dem löslichen Peptid inkubiert, welches dann in die Bindungsgrube eines HLA-A\*0201 Komplexes bindet. Dies geschieht durch Verdrängung eines bereits gebundenen Peptides oder durch Bindung in eine leere Bindungsgrube. FACS-Experimente wurden an folgenden Zelltypen durchgeführt:

1. peptidgepulste T2-Zellen (HLA-A\*0201<sup>+</sup>)
2. peptidgepulste EBV-immortalisierte B-Lymphoblasten (HLA-A\*0201<sup>+</sup> und HLA-A\*0201<sup>-</sup>)
3. stabil transfizierte HEK-Zellen (CMV-pp65<sub>495-503</sub>)



**Abbildung 10: Fab-Antikörper H11 auf pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201-beladenen T2-Zellen sowie weiteren T2-Zellen, beladen mit diversen Kontrollpeptiden.** Unbeladene T2-Zellen (rote flächig ausgefüllte Kurve, „leere Zellen“); H11-Fab-Antikörper (grün); sekundäre Antikörperreaktion mit T2-Zellen, gefärbt mit anti-c-myc Antikörper (schwarz, „sek. AK“); ungepulste T2-Zellen nach Inkubation mit PBS ohne Peptidbeladung (blau, „un gepulst“); T2-Zellen, beladen mit Peptid Melan-A26-35 (lila); T2-Zellen, beladen mit Peptid G250254-262 (rot); T2-Zellen, beladen mit Peptid Tert540-548 (braun); T2-Zellen, beladen mit Positivkontrollpeptid BB7.2 (blau).

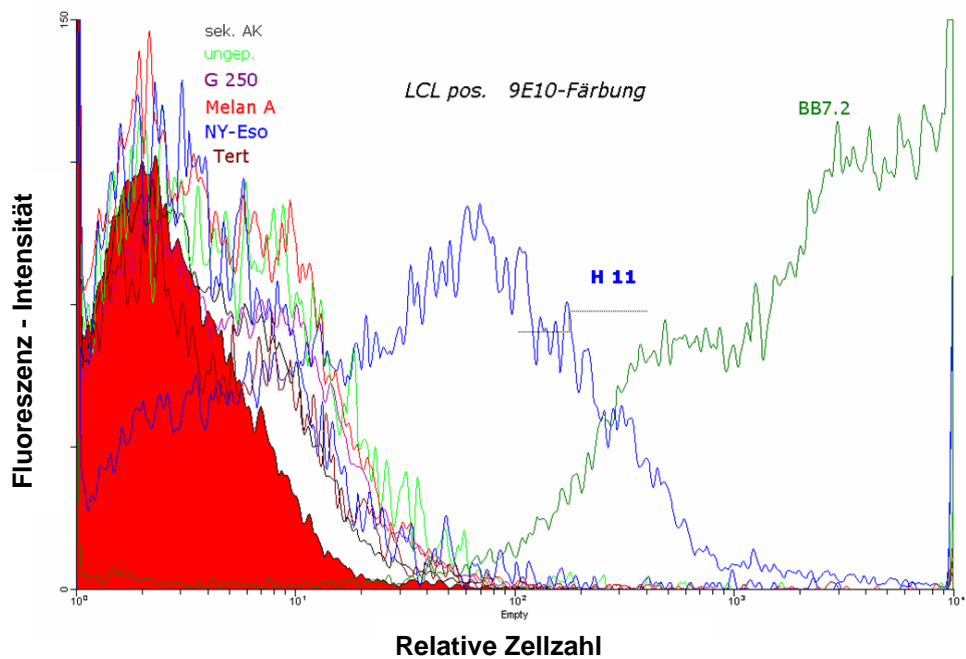




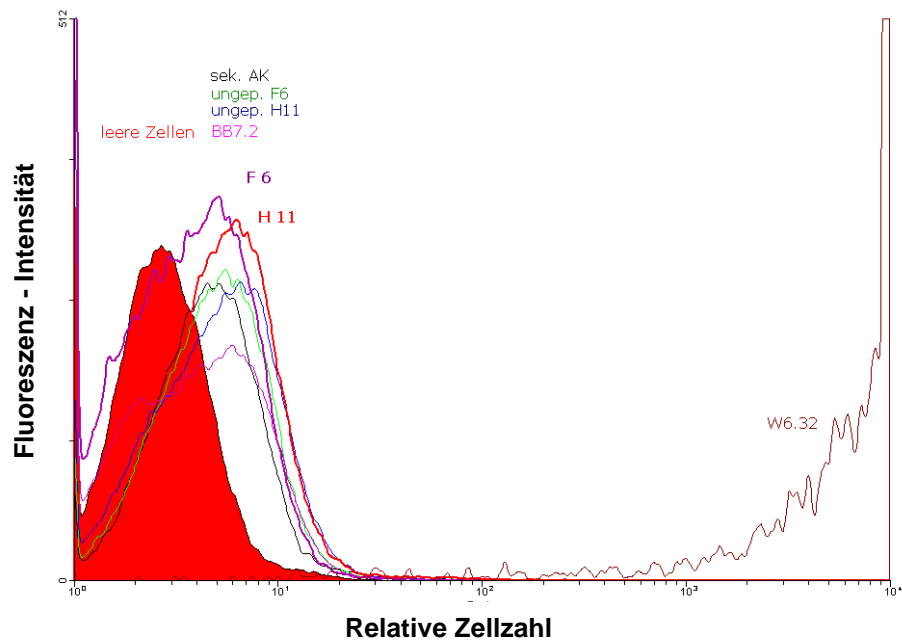
**Abbildung 11: Fab-Antikörper F6 auf pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201-beladenen T2-Zellen sowie weiteren T2-Zellen mit diversen Kontrollpeptiden.** Unbeladene T2-Zellen (rote flächig ausgefüllte Kurve, „leere Zellen“); F6-Fab-Antikörper (lila); sekundäre Antikörperreaktion mit T2-Zellen, gefärbt mit anti-c-myc Antikörper (schwarz, „sek. AK“); ungepulste T2-Zellen nach Inkubation mit PBS ohne Peptidbeladung (blau, „ungepulst“); T2-Zellen, beladen mit Peptid Melan-A26-35 (grün); T2-Zellen, beladen mit Peptid G250254-262 (rot); T2-Zellen, beladen mit Positivkontrollpeptid BB7.2 (blau).

Während der Klon H11 (Abbildung 10) ausschließlich das Untersuchungspeptid CMV-pp65<sub>495-503</sub> und nicht die Kontrollpeptide Melan A, G250, Tert bindet, reagiert der Klon F6 (Abbildung 11) sowohl mit Melan A als auch mit G250 kreuzreaktiv. Von einer weiteren Berücksichtigung des Klon F6 wurde fortan abgesehen.

Als nächster Untersuchungsschritt wurde das Bindungsverhalten des verbliebenen Fab-Antikörpers H11 mit HLA-A2-positiven sowie HLA-A2-negativen LCL-Zellen geprüft.



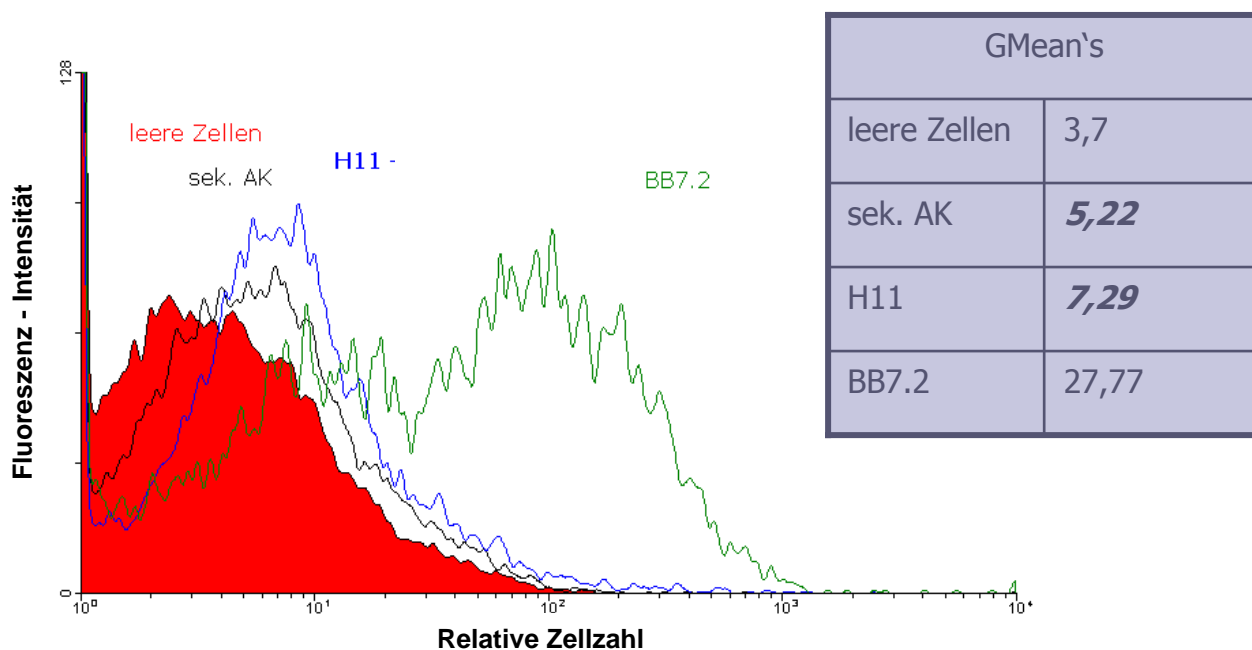
**Abbildung 12: Fab-Antikörper H11 auf pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201-beladenen positiven LCL-Zellen sowie weiteren pos. LCL-Zellen, beladen mit diversen Kontrollpeptiden.** Unbeladene pos. LCL-Zellen (rote flächig ausgefüllte Kurve); H11 - Fab-Antikörper (blau, „H11“); sekundäre Antikörperreaktion mit pos. LCL-Zellen, gefärbt mit anti-c-myc Antikörper (schwarz, „sek. AK“); ungeladene pos. LCL-Zellen nach Inkubation mit PBS ohne Peptidbeladung (grün, „ungeladene Zellen“); Pos. LCL-Zellen, beladen mit Peptid Melan-A26-35 (rot); Pos. LCL-Zellen, beladen mit Peptid Tert540-548 (braun); Pos. LCL-Zellen, beladen mit Peptid NY-Eso157-165 (blau); Pos. LCL-Zellen, beladen mit Peptid G250254-262 (lila); Pos. LCL-Zellen, beladen mit Positivkontrollpeptid BB7.2 (grün).



**Abbildung 13: Fab-Antikörper H11 und F6 auf pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201-beladenen und unbeladenen negativen LCL-Zellen.** Unbeladene neg. LCL-Zellen (rote flächig ausgefüllte Kurve, „leere Zellen“); H11 - Fab-Antikörper (rot, „H11“); F6 - Fab-Antikörper (lila, „F6“); sekundäre Antikörperreaktion mit neg. LCL-Zellen, gefärbt mit anti-c-myc Antikörper (schwarz, „sek. AK“); ungepulste neg. LCL-Zellen nach Inkubation mit PBS ohne Peptidbeladung und Zugabe von Klon F6 (grün, „ungep. F6“); ungepulste neg. LCL-Zellen nach Inkubation mit PBS ohne Peptidbeladung und Zugabe von Klon H11 (blau, „ungep. H11“); Neg. LCL-Zellen, beladen mit Negativkontrollpeptid BB7.2 (helllila); Neg. LCL-Zellen, beladen mit Positivkontrollpeptid W6.32 (braun).

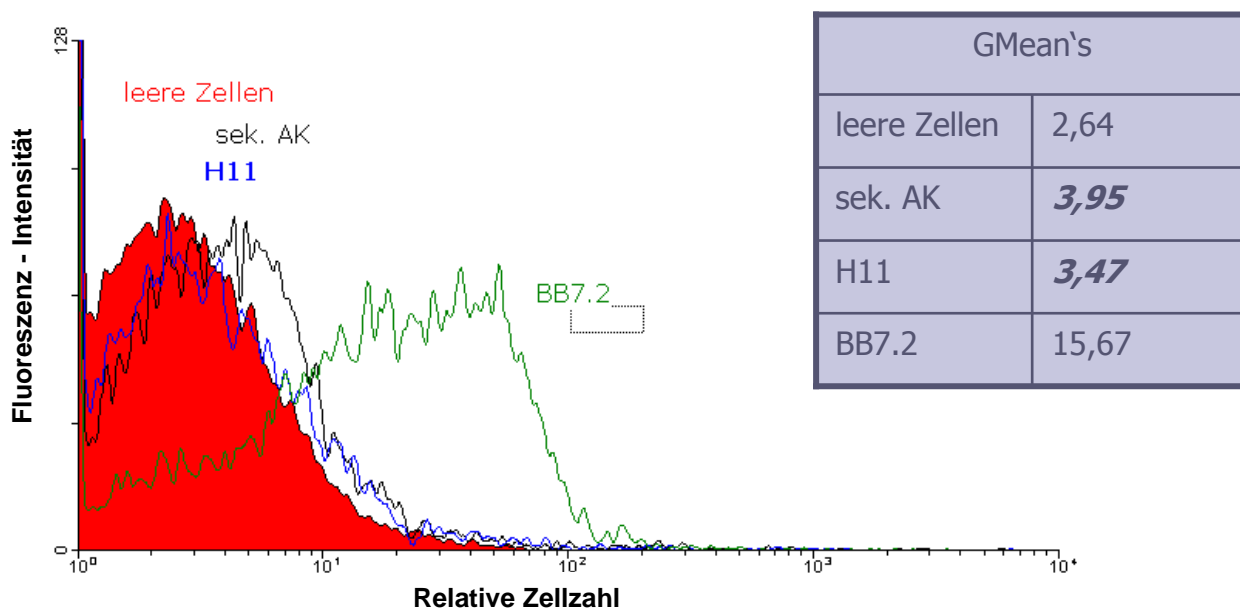
In diesen Untersuchungen zeigt Klon H11 (Abbildung 12 und 13) auf HLA-A2-positiven LCL-Zellen ein hochspezifisches Bindungsverhalten gegenüber dem Untersuchungspeptid und ein nichtbindendes Verhalten auf HLA-A2-negativen LCL-Zellen.

Den Testungen an peptidgepulsten T2- und LCL-Zellen folgten FACS-Messungen an CMV-pp65<sub>495-503</sub>-stabil-transfizierten HEK-Zellen sowie als Referenz mit nicht transfizierten HEK-Zellen, um zu demonstrieren, dass der Fab-Phage H11 den MHC-Peptid-Komplex erkennt wie er nach endogener Prozessierung präsentiert wird.



**Abbildung 14: Fab-Phage H11 auf stabil transfizierten HEK293-Zellen (HLA-A2<sup>+</sup>).**

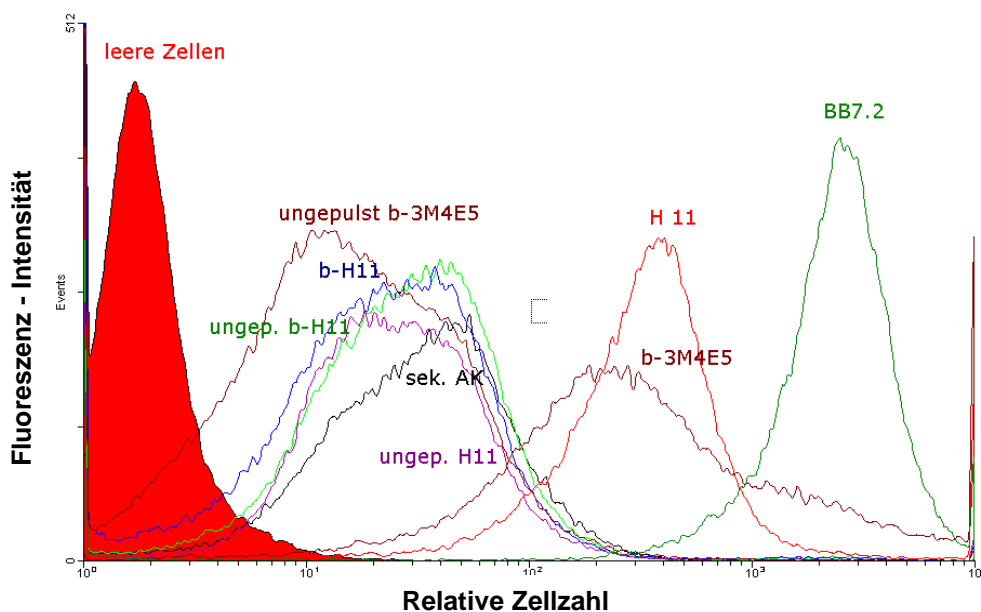
Unbeladene stabil bzw. nicht stabil transfizierten HEK293-Zellen (HLA-A2<sup>+</sup>, rote flächig ausgefüllte Kurve, „leere Zellen“); H11 - Fab-Phage (blau, „H11“); sekundäre Antikörperreaktion mit den HEK293-Zellen, gefärbt mit alpha-M-13 Antikörper (schwarz, „sek. AK“); HEK293-Zellen, beladen mit Negativkontrollpeptid BB7.2 (grün).



**Abbildung 15: Fab-Phage H11 auf nicht stabil transfizierten HEK293-Zellen (HLA-A2<sup>+</sup>).** Farbuordnungen analog zu Abbildung 14.

Der Fab-Phage H11 konnte den pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201 Komplex auf den stabil mit pp65 transfizierten Zellen (Abbildung 14) im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen (Abbildung 15) mit signifikantem Unterschied erkennen. Zwar war der Unterschied der Signalstärken nicht sehr ausgeprägt, in der Berechnung des geometrischen Mittels GMean wird jedoch ein deutlicher Unterschied in der Signalintensität erkennbar.

Zuletzt wurde die Spezifität des Fab H11 in einer FACS-Analyse analysiert, die gleichsam den etablierten spezifischen Antikörper b-3M4E5 und den Fab H11 (jeweils auf peptidgepulsten und ungeladenen T2-Zellen) umfasste.



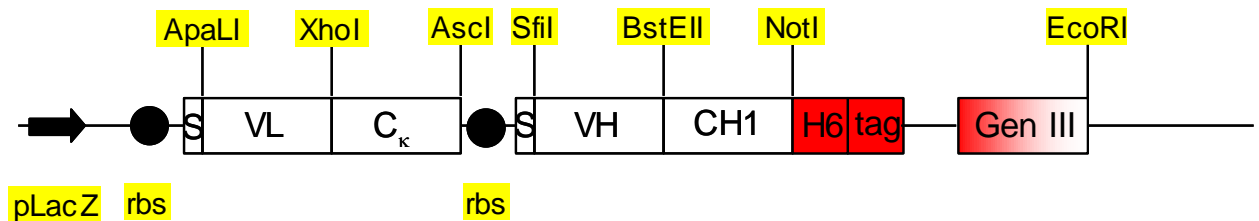
**Abbildung 16: Fab-Antikörper H11 und Antikörper b-3M4E5 auf peptidbeladenen T2-Zellen.** Unbeladene T2-Zellen (rote flächig ausgefüllte Kurve, „leere Zellen“); H11-Fab-Antikörper (rot); sekundäre Antikörperreaktion mit T2-Zellen, gefärbt mit anti-c-myc Antikörper (schwarz, „sek. AK“); Antikörper b-3M4E5 (lila); T2-Zellen, beladen mit Positivkontrollpeptid BB7.2 (grün); Die übrigen nicht kommentierten Kurven in der Abbildung sollen keine Berücksichtigung erfahren.

In Abbildung 16 zeigt der Fab-Antikörper H11 mit ähnlicher Signalstärke wie der etablierte, biotinylierte 3M4E5 (bzgl. Peptid NY-ESO-1) ein spezifisches

Bindungsverhalten gegenüber dem Untersuchungspeptid pp65<sub>495-503</sub> im HLA-A\*0201 Komplex [Held et al., 2004].

## 5.9 DNA-Sequenzierung

Die den Fab-Antikörper kodierende Sequenz befindet sich im Plasmid pCES 3' des lacZ-Promotors und 5' der die konstanten Schwerkettenregion CH1 mit dem His-tag und dem gIII-Hüllprotein kodierenden Fusionsgen.



**Abbildung 17: Schematischer Aufbau des Plasmid pCES1 mit Gensequenzen eines Fabs als Insert**

Das den Fab H11 kodierende Plasmid wurde sequenziert. Im Fall der Sequenzierung des Klon H11 diene pUC-Reverse (5' – AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG – 3') und CH1 (5' – TGG ACG CCG CTG GTC AGG – 3') als Primer. pUC-Reverse bindet im Plasmid pCES unmittelbar 5' vor der Signalsequenz der leichten Kette und der Primer CH1 in der CH1 Region der schweren Kette. Folgend ist die Fab-Gensequenz, gelesen ab CH1 als Basentriplett- und Aminosäurenfolge, gelistet:

**Tabelle 11: Variable Schwereketten  $V_H$  des Fab H11 als Basentriplett- und Aminosäurenfolge mit Einteilung der hypervariablen CDR-Bereiche und der hypovariablen Frameworks FWR**

	<----- FWR 1 ----->																								
	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	S	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G
	G	C	C	G	C	T	G	G	G	G	A	A	C	G	T	T	G	A	G	T	T	A	G	T	G
	T	A	T	T	A	C	G	C	A	T	A	A	C	G	C	C	T	A	T	C	G	A	C	C	G
	C	G	G	G	G	T	G	T	G	G	G	G	T	G	C	A	G	G	C	C	C	G	T	T	A

	----->				CDR 1					<----- FWR 2 ----->															
	G	T	F	S	S	Y	A	I	S	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	G	I
	G	A	T	A	A	T	G	A	A	T	G	C	C	G	C	G	C	G	C	G	T	A	G	G	A
	G	C	T	G	G	A	C	T	G	G	T	G	A	C	C	G	A	G	T	A	G	T	G	G	T
	C	C	C	C	C	T	T	C	C	G	G	A	G	C	T	A	A	G	T	G	G	G	A	G	C

	CDR 2															<----->									
	I	P	I	L	G	I	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	I	T	A	D	K	S	T
	A	C	A	C	G	A	G	A	T	G	C	A	T	C	G	A	G	A	A	A	G	G	A	T	A
	T	C	T	T	G	T	C	A	A	C	A	A	T	A	G	G	T	C	T	C	C	A	A	C	C
	C	T	C	T	T	A	A	C	C	A	G	G	C	G	C	A	C	G	T	C	G	C	A	C	G

	<----- FWR 3 ----->																			CDR 3					
	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	N	L	V
	A	A	G	T	A	G	C	A	A	C	A	T	G	G	A	G	G	T	T	T	G	A	A	C	G
	G	C	C	A	T	A	T	G	G	T	G	C	A	A	C	C	T	A	A	G	C	G	A	T	T
	C	A	C	C	G	G	G	C	C	G	A	T	G	C	G	C	G	T	C	T	G	A	T	A	T

	CDR 3			<----- FWR 4 ----->															CH1			
	G	T	A	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	P	Stopp		P	
	G	A	G	T	T	G	T	T	G	C	G	A	C	G	A	G	T	5'C	T		C	
	G	C	C	A	T	A	A	G	G	A	G	C	T	T	C	T	C	C	G		C	
	T	G	C	C	T	C	C	G	C	G	C	C	G	C	C	C	C	C	A		A	



**Tabelle 12: Variable Leichtkette  $V_L$  des Fab H11 als Basentriplett- und Aminosäurenfolge mit Einteilung der hypervariablen CDR-Bereiche und der hypovariablen Frameworks FWR**

	----- FWR 1 ----->																		CDR 1						
	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V
	A	C	T	C	G	A	C	T	T	T	C	G	G	A	G	A	C	T	T	A	G	A	C	A	G
	C	A	C	C	G	C	T	C	T	C	C	G	A	G	C	C	T	C	G	G	C	G	A	G	T
	G	G	T	A	C	C	G	T	G	T	A	G	A	A	C	C	C	C	G	C	T	G	T	T	

	CDR 1					< ----- FWR 2 ----- >															CDR 2		
	S	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	V	I	Y	G	A
	A	A	A	T	T	G	T	T	C	C	A	C	G	C	G	C	A	C	G	A	T	G	G
	G	G	G	A	T	C	G	A	A	A	A	C	G	A	C	C	G	T	T	T	A	G	C
	C	C	C	C	A	C	G	C	G	G	A	T	C	G	T	C	G	C	C	C	T	T	A

	CDR 2					< ----- FWR 3 ----- >																	
	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
	T	A	A	G	A	G	A	C	G	A	T	A	G	A	G	T	G	A	G	T	A	C	A
	C	G	G	C	C	G	T	C	A	G	T	G	G	G	G	C	G	C	A	T	C	T	C
	C	C	G	C	T	C	C	A	C	G	C	T	C	T	G	T	G	A	C	C	T	C	C

	----- FWR 3 ----- >													
	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C
	A	A	A	C	G	C	G	G	T	G	G	T	T	T
	T	G	G	T	A	C	A	A	T	C	T	A	A	G
	C	C	A	G	G	T	A	T	T	A	T	T	C	T

## 6 Diskussion

### Selektion des Fab-Antikörpers

In der vorliegenden Arbeit wurden aus einer Phagemidbank Fab-Antikörper selektioniert und anschließend charakterisiert, welche spezifisch MHC-Peptid-Komplexe bestehend aus einem HLA-A\*0201-Molekül sowie dem Peptid 495-503 des Tegumentphosphoprotein pp65 von CMV zu binden vermögen. Diese Bindung geschieht in einer dem T-Zell-Rezeptor analogen Art und Weise.

ELISA-Analysen zeigten, dass der Fab-Antikörper H11 nach Expression auf der Oberfläche eines Phagen nur auf solchen löslichen, rekombinanten MHC-Peptid-Komplexen eine Reaktion zeigte, wenn das Epitop von pp65 präsentiert wurde. Im Falle eines Epitops, im Kontext eines HLA-A\*0201-Moleküls präsentiert, konnte keine Reaktivität des Fab-Antikörper H11 nachgewiesen werden. Andere im Rahmen dieser Selektion identifizierte Klone reagierten mit einer signifikanten Kreuzreaktion, erwiesen sich somit als nicht MHC-Peptid-spezifisch. Nach externer Beladung HLA-A\*0201-positiver T2-Zellen mit einem Panel an HLA-A\*0201-restringierter Epitope zeigte der Fab-Antikörper H11 lediglich eine Reaktivität gegen das Epitop aus pp65. Analog aufgebaute Analysen wurden mit HLA-A\*0201-positiven EBV-immortalisierten B-Zellen durchgeführt, welche den T2-Zellen analoge Ergebnisse ergaben. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Fab-Antikörpern H11 um eine im Rahmen der getesteten Kontroll-Epitope spezifische Bindung handelt. Des Weiteren konnte mittels durchflusszytometrischer Analysen auf HLA-A\*0201-negativen EBV-immortalisierten B-Zellen gezeigt werden, dass die Peptid-spezifische Bindung der Fab-Antikörper Allel-spezifisch ist, d.h. sie interagieren nur, wenn das Peptid im Kontext eines HLA-A\*0201 Komplex präsentiert wird.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden sehr umfangreich gestaltet, um Aussagen zur Spezifität mit größtmöglicher Validität machen zu können. Vergangene Studien über Antikörper, die zunächst als spezifisch für ein bestimmtes Antigen galten, um erst später als kreuzreagierend entlarvt zu werden, zeigten die Notwendigkeit der intensiven Vorabprüfung der Spezifität.

Beispielhaft sei ein bereits kommerziell vertriebener Antikörper (Klon 01085, Roche) mit angeblicher Spezifität für foxP3 genannt. Seine fehlende Spezifität stellte sich erst heraus, als verschiedene Labore nicht interpretierbare Ergebnisse produzierten. Mittlerweile ist der Antikörper vom Markt genommen worden.

Die Phage-Display-Technologie zur Generierung solch spezifischer Antikörper stellt in diesem Zusammenhang eine hervorragende Methode zur Spezifitätsprüfung dar. Die Methode des Phagendisplay ermöglicht es, aus einer sehr großen Bibliothek verschiedener Proteine diejenigen zu selektionieren, die an ein bestimmtes Zielmolekül binden. Dafür werden die Proteine auf Bakteriophagen präsentiert. Die Präsentation von Proteinen auf Phagen (Phagendisplay) wird ermöglicht, indem das Peptid bzw. dessen DNA mit einem Phagenhüllprotein bzw. der dafür kodierenden DNA verknüpft wird. Somit entsteht eine physikalische Verbindung zwischen dem präsentierten Protein (Phänotyp) und der dafür codierenden DNA (Genotyp). Durch die kombinatorische Mutagenese des Fusionsgens kann eine große Diversität (oft mehr als eine Milliarde verschiedene Varianten) in das zu präsentierende Peptid eingebracht werden.

### **Spezifität des Fab-Antikörpers**

Die Detektion des pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201-Komplexes auf stabil mit pp65 transfizierten, HLA-A\*0201-exprimierenden HEK293 Zellen entspricht mehr der Situation, wie sie sich bei mit CMV-infizierten Zellen vorfindet. Das Peptid gelangt im Kontext des MHC-Komplexes erst an die Oberfläche der Zelle nach komplexer, endogener Prozessierung des pp65 Proteins. Das in der Durchfluss-Zytometrie mit dem Fab H11 gemessene Signal ist sehr niedrig, in seiner Quantität am unteren Ende der methodischen Nachweisgrenze. Somit ist die absolute Zahl von pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201-Komplexe auf den HEK293 Zellen sehr gering. Dabei handelt es sich um ein bekanntes Phänomen. Bislang erschienen einige Publikationen, die sich mit der Quantifizierung der Antigenpräsentation auf MHC-I-Molekülen beschäftigten. Die endogene Prozessierung eines intrazellulären Antigens und die anschließende

Präsentation im Verbund mit dem HLA-A\*0201 Komplex stellt einen ineffizienten Mechanismus dar. Ein einzelnes Peptid wird lediglich in einer geringen Zahl von Kopien auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen dargeboten [Engelhard et al., 2002]. Mehrere Gründe werden dafür verantwortlich gemacht. Während der endogenen Prozessierung im Proteasom verarbeitete Peptide werden nach Länge ausgesondert, zu lange und zu kurze Sequenzen erhalten keinen Zugang zum ER [Cascio et al., 2001]. Des Weiteren entfernen Aminopeptidasen im Cytosol fortwährend Aminosäurereste von den Antigenpeptiden, so dass für die Weiterverarbeitung mittels TAP-Transport ins ER nur wenige Sekunden verbleiben [Serwold et al. 2002]. Hinsichtlich der Erkennung antigener Peptide in Komplexen HLA-A\*0201 durch spezifische Fab-Antikörper ist die intrazelluläre Peptid-Prozessierung der limitierende Faktor für die Präsentation auf der Oberfläche. Dies zeigten Studien, in denen die endogene Prozessierung von GFP-markierten Vollängenproteinen hinsichtlich ihrer Effizienz der Antigen-Oberflächenpräsentation untersucht wurden [Held et al., 2007]. 16.000 bis 52.000 Proteine des Melanom-spezifischen Proteins Melan-A wurden intrazellulär synthetisiert um einen MHC-Komplex mit einem Melan-A entstammenden Peptid auf der Oberfläche zu präsentieren.

Die direkte Detektion oder Visualisierung der Endstrecke der Antigen-Prozessierung in Form eines distinkten MHC-Peptid Komplexes in unmanipulierten Zellsystemen stellt sich somit trotz des Werkzeuges eines spezifischen Antikörpers als methodisch anspruchsvoll dar. Mit der Durchfluss-Zytometrie arbeitete man in dieser Arbeit an der unteren Nachweisgrenze. Manche MHC-präsentierte Epitope lassen sich jedoch aufgrund ihrer niedrigen Anzahl nicht mit der letzt-genannten Methodik detektieren. Dies war bei einem HLA-A\*0201-restringierten Peptides SSX2<sub>103-111</sub> aus dem cancer-testis Antigen SSX2 der Fall. Mittels der sensitiveren Fluoreszenz-Mikroskopie gelang jedoch die direkte Visualisierung der MHC-Peptid-Komplexe auf unmanipulierte Melanomzellen [Held et al., 2009]. Der direkte Nachweis eines MHC-Peptid-Komplexes ist aber in vielen Anwendungen der zurzeit gebräuchlicheren Methodik der Messung der Reaktivität spezifischer T Zell Linien oder Klone

vorzuziehen. Diese funktionellen Assays stellen erheblich artifiziell veränderte Testsysteme dar, die von vielen bekannten aber auch unbekannten Variablen beeinflusst werden.

Die Untersuchung der Antigen-Prozessierung und -Präsentation von Viren, insbesondere CMV in ihren Wirtszellen ist von erheblichem Interesse um ihre Latenz im Organismus erklären zu können. Zahlreiche Theorien einer geringen Oberflächenpräsentation der Antigen-MHC-I-Komplexe werden diskutiert. *In vitro* blockieren verschiedene Glykoproteine, z.B. US6, den TAP-vermittelten Peptidtransport ins Endoplasmatische Retikulum und reduzieren so die Präsentation von MHC-I-Molekülen. Da *in vivo* in immungesunden Organismen solche Evasionsmechanismen alleine eine eliminierende Immunantwort verhindern würden, stehen dieser Evasion Mechanismen gegenüber, wie die Freisetzung von Interferon- $\gamma$  und Zytokinen. Die Mediatoren sorgen dafür, dass die Blockierung des MHC-I-Prozessierungsweges zumindest teilweise überwunden wird. Andererseits inhibiert bei einer CMV-Infektion die Anwesenheit des CMV-Proteins pp65 die Produktion von antiviralen Genen, z.B. INF- $\beta$ . Dies führt in der Folge zu einer Reduktion der MHC-I-Antigen-Präsentation. Ein Gleichgewicht zwischen Immunevasionsstrategien einerseits und generellen potentiellen CMV-Infektiösität wird für die Tatsache der lebenslangen Latenz des CMV verantwortlich gemacht. Die Reaktivierungen nach Immunsuppression lassen sich mit diesem Modell ebenfalls gut erklären [Hengel H et al., 1997, 1998].

Virale Pathogene haben diverse Evasionsstrategien, die ein Entkommen vor der Zerstörung durch das Immunsystem und eine teilweise lebenslange Latenz im Körper des Wirtes ermöglichen. Dazu werden *escape*-Mechanismen (Virus täuscht Nichtinfektion vor), *resistance*-Mechanismen (Hemmung intrazellulärer Signalwege) und *counterattack*-Mechanismen (Außerkraftsetzen von Immunteilsystemen) gezählt. Der Bereich der *escape*-Beeinflussung der Immunantwort umfasst bei der HCMV-Infektion u.a. die Downregulation von Oberflächen-MHC-I-Molekülen und die Reduktion des so genannten *cross-priming*, wobei Antigene durch bisher unbekannte Mechanismen vom Endosom ins Cytosol prozessiert und anschließend auf klassischem Wege im MHC-I-

Komplex präsentiert werden. Weiterhin bewirkt die Anwesenheit des CMV-Tegumentproteins pp65 mit seiner Kinaseaktivität eine Phosphorylierung des 72-kDa-IE-Proteins, so dass dieses Antigen IE des CMV nicht mehr als Peptid an ein MHC-I-Molekül gebunden werden kann. In der Folge davon reduziert sich die cytotoxische T-Zell-Antwort des Immunsystems. Ein exprimiertes Protein US3 hält die MHC-I-Moleküle im ER zurück und die Proteine US2 sowie US11 fördern den Abbau von MHC-I-Molekülen durch Proteasomen [Tortorello et al., 2000]. Einige Viren, darunter auch das CMV, haben im Laufe der Evolution unter dem Druck des adaptiven Immunsystems weitere Mechanismen entwickelt. Yewdell beschreibt mehrere VIPRs (viral proteins interfering with antigen presentation), die nach Sekretion durch die Antigen-präsentierenden Zellen zu einer Reduktion der cytotoxischen T-Zell-Antwort führen. Die oben genannten Genprodukte US2, US3, US6 und US11 zählen zu diesen VIPRs [Yewdell et al., 2002]. Im Falle der Antigen-Prozessierung und -Präsentation von pp65 im Kontext von HLA-A\*0201 stellte eine andere Arbeitsgruppe den Weg des pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201 Komplexes durch die zellulären Kompartimente dar. Sie generierten einen wie in unserer Arbeit dargestellten MHC-Peptid-spezifischen Antikörper und visualisierten mittels Fluoreszenzmikroskopie, dass eine große Anzahl von pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201 Komplexen im Golgi Kompartiment akkumulierte. Dieser Pool entspricht nahezu allen HLA-A\*0201 Molekülen der infizierten humanen Fibroblasten. Lediglich ca. 100 pp65<sub>495-503</sub>/HLA-A\*0201 Komplexe verlassen das Golgi Kompartiment und werden auf der Zelloberfläche präsentiert. Dieses Phänomen ist unabhängig von den eine Immunevasion instrumentalisierenden, viral-kodierten Proteinen der US2-11 Region, da es auch nach Infektion mit der Verlustmutante HV798 beobachtet worden war [Makler et al., 2010].

Die Theorien zur Immunevasion wurden durch Untersuchungen an Mäusen von Munks et al. relativiert, indem dort nachgewiesen werden konnte, dass die Ab- oder Anwesenheit von Immunevasinen in vivo keinen wesentlichen Beitrag zur cytotoxischen T-Zell-Antwort hat [Munks et al., 2007]. Diese Ergebnisse belegen die Annahme, dass die Erklärungsansätze zur Immunevasion, die durch in vitro-Experimente gestützt sind, durch weiterführende Untersuchungen

in vivo angepasst werden sollten. Es muss auch konstatiert werden, dass über die Wirksamkeit der MHC-Klasse-I-Downregulation in vivo bisher wenig bekannt ist.

### **Perspektiven**

Neben den eher grundlagenwissenschaftlichen Anwendungen könnten MHC-Peptid-spezifische Antikörper therapeutisch zur Anwendung kommen. Die Antikörper detektieren ein zugängliches, sich auf der Zelloberfläche befindendes Antigen. Als Fusionsprotein können MHC-Peptid-spezifische Fab-Antikörper beispielsweise gekoppelt mit einem Exotoxin aus *Pseudomonas aeruginosa* bereits erfolgreich in einem Mausmodell eingesetzt werden. *Klechevsky et. al.* [Klechevsky et al., 2008] generierten auf der Basis MHC-Peptid-spezifischer Fab-Antikörper eine „neue“ Antikörperklasse, sogenannte Immunotoxine, welche sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Mausmodell zur Tumorregression führten. Dazu generierten sie aus MART-126-37-spezifischen Fab-Antikörpern ein Fusionsprodukt mit dem verkürzten Exotoxin aus *Pseudomonas aeruginosa*. Das Fusionsprodukt, ein sogenanntes Immunotoxin, hatte somit die Bindungseigenschaften des Fab-Antikörpers sowie die Toxineigenschaften des Exotoxins und konnte daher nach spezifischer Bindung an Melanomzellen internalisiert werden und schließlich zum Zelltod führen. Dies zeigten *Klechevsky et. al.* in vitro mittels Fluoreszenzmikroskopie und der Nachweis der Hemmung der Proteinsynthese. In vivo konnte die Wirksamkeit des Immunotoxins mittels Mausmodell an bestrahlten NOD-SCID  $\beta 2m$ -defizienten Mäusen gezeigt werden. Es kam zu einer dosisabhängigen Abnahme des Tumorumfanges um bis zu 75% des Ausgangsvolumens.

Ein weiterer potentieller Einsatz von MHC-Peptid-spezifischen Antikörper liegt in der Inhibition der T-Zell-Reaktivität, insbesondere bei autoimmun-entzündlichen Erkrankungen. Ein Vorteil dieses noch hypothetischen und experimentellen therapeutischen Ansatzes wäre eine sehr spezifische Inhibition entzündlicher Prozesse ohne Gefahr der Infektanfälligkeit wie beim Einsatz herkömmlicher Immunsuppressiva. Tatsächlich konnte am Modell des Typ-II Diabetes eine Inhibition von HLA-DR4-restringierten T-Zellen in der Maus

demonstriert werden, die reaktiv gegen eine Epitop des Inselzell-Antigen Glutamat Decarboxylase 65 (GAD65) sind [Dahan et al., 2013]. Einschränkend muss jedoch konstatiert werden, dass bei vielen autoimmunentzündlichen Erkrankungen eine Plethora von T-Zell-Epitopen zu erwarten ist, die die Diversität des HLA-Systems sehr individualisieren und damit aufwendig sowie potentiell teure Therapiestrategien erforderlich machen würden.

Zusammengefasst stellen die von uns generierten und charakterisierten Antikörper Reagenzien mit exklusiver Spezifität dar, mit denen drängende immunologische Fragestellungen zukünftig bearbeitet werden können. Ihre Relevanz wird durch einen potentiellen therapeutischen Einsatz weiter gesteigert.



## 7 Literaturverzeichnis

- 1) **Aharoni R, Teftelbaum D, Arnon R, Puri J (1991)**  
Immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis by antibodies to the antigen–Ia complex; **Nature 351, 147-150**
- 2) **Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Wurzner R, Schonitzer D, Grubeck-Lobenstein B (2005)** *Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine profile in elderly persons;* **J Virol 79; 3675-3683**
- 3) **Brüggemann M, Winter G, Waldmann H, Neuberger MS (1989)**  
*The immunogenicity of chimeric antibodies;* **JEM vol. 170 no.6; 2153-2157**
- 4) **Cascio P et al. (2001)** *26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide;* **Embo J 30(5): 557-61**
- 5) **Catipovic B et al. (1994)** *Analysis of the structure of empty and peptide-loaded major histocompatibility complex molecules at the cell surface;* **J Exp Med 180(5) 1753-61**
- 6) **Chaga G, Bochkariov DE, Jokhadze GG, Hopp J, Nelson P (1999)** *Natural poly-histidine tag for purification of recombinant proteins on cobalt (II)-carboxymethylaspartate crosslinked agarose;* **J Chromatogr A 864: 247-256**
- 7) **de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, de Bruine AP, Arends JW, Hoogenboom HR (1999)** A

- large non-immunized human Fab Fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies; J Biol Chem. 274(26):18218-30*
- 8) Dahan R, Gebe JA, Preisinger A, James EA, Tendler M, Nepon GT, Reiter Y (2013) *Antigen-specific immunomodulation for type 1 diabetes by novel recombinant antibodies directed against diabetes associates auto-reactive T cell epitope. J Autoimmun 47:83-93*
- 9) Engelhard VH, Brickner AG, Zarling AL (2002) *Insights into antigen processing gained by direct analysis of the naturally processed class I MHC associated peptide repertoire; Mol Immunol, 39(3-4): p. 127-37*
- 10) Engvall E, Perlman P (1971) *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of Immunoglobulin G; Immunochemistry 8: 871-879*
- 11) Fischer, P. (1996) *Expression des humanen Antikörperrepertoires mit Bakteriophagen: Techniken, Anwendungen und Perspektiven; Biospektrum, 2: 26-29*
- 12) Fremont DH et al. (1992) *Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb Science 257(5072) 919-27*
- 13) Held G, Matsuo M, Epel M, Gnjjatic S, Ritter G, Lee YS, Tai TY, Cohen CJ, Old LJ, Pfreundschuh M, Reiter Y, Hoogenboom HR, Renner C (2004) *Dissecting cytotoxic T cell responses towards the NY-ESO-1 protein by peptide/MHC-specific antibody Fragments; Eur. J. of Immunol. 34: 2919–2929*

- 14) Held G, Wadle A, Dauth N, Stewart-Jones G, Sturm C, Thiel M, Zwick C, Dieckmann D, Schuler G, Hoogenboom HR, Lévy F, Cerundolo V, Pfreundschuh M, Renner C (2007) *MHC-peptide-specific antibodies reveal inefficient presentation of an HLA-A\*0201-restricted, Melan-A-derived peptide after active intracellular processing*; **Eur. J. of Immunol.** 37: 2008–2017
  
- 15) Held G, Neumann F, Sturm C, Kaestner L, Dauth N, de Bruijn DR, Renner C, Lipp P, Pfreundschuh M (2009) *Differential presentation of tumor antigen-derived epitopes by MHC-class I and antigen-positive tumor cells*; **Int J Cancer** 123(8):1841-7
  
- 16) Hengel H, Koopmann JO, Muranyi W, Goulmy E, Hämmerling GJ, Koszinowski, UH, Momburg F (1997) *A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter*; **Immunity** 6: 623-632
  
- 17) Hengel H, Brune W, Koszinowski UH (1998) *Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist*; **Trends Microbiol.** 6: 190 -197
  
- 18) Hoogenboom HR, Griffiths AD et al. (1991) *Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains*; **Nucleic Acids Research** 19 (15); 4133-4137
  
- 19) Hoogenboom HR, Rondon I, Hufton S, van Neer N, Hoet R (2000) *Phage Display Technologie: Experimental Handbook on the Use of Phage Antibody Libraries and their Applications*; **Dyax Corp., Target Quest SOPs Version 1**

- 20) Hulpke S, Baldauf C, Tampé R (2012) *Molecular architecture of the MHC I peptide-loading complex: one tapasin molecule is essential and sufficient for antigen processing*; **FASEB Journal** 26(12):5071-80
- 21) Huse WD, Sastry L, Iverson SA, Kang AS, Alting-Mees M, Burton DR, Benkovic SJ, Lerner RA (1989) *Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda*; **Science** 246: 1275-1281
- 22) Hutter H, Hammer A, Blaschitz A, Hartmann M, Ebbesen P, Dohr G, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B (1996) *Expression of HLA class I molecules in human first trimester and term placenta trophoblast* **Cell and Tissue Res** 286: 439-447
- 23) Johansen TE et al. (1997) *Peptide binding to MHC class I is determined by individual pockets in the binding groove*; **Scand J Immunol** 46(2) 137-46
- 24) King J, Laemmli UK (1971) *Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4*; **J. Mol. Biol.** 62: 465–477
- 25) Klechevsky E, Morita R, Liu M, Cao Y, Coquery S, Thompson-Snipes L, Briere F, Chaussabel D, Zurawski G, Palucka AK (2008) *Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells*; **Immunity** 29: 497–510
- 26) Klinke R, Silbernagel S (2003) *Lehrbuch der Physiologie, 4. Auflage*, Thieme Verlag
- 27) Laemmli UK (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*; **Nature**, 227:680-685

- 28) **Li S et al.(2000)** *Tapasin is required for efficient peptide binding to transporter associated with antigen processing*; **J Biol Chem 275(3): 1581-6**
- 29) **Niedermann G et al. (1999)** *The specificity of proteasomes: impact on MHC class I processing and presentation of antigens*; **Immunol Rev172: 29-48**
- 30) **Makler O, Oved K, Netzer N, Wolf D, Reiter Y (2010)** Direct visualization of the dynamics of antigen presentation in human cells infected with cytomegalovirus revealed by antibodies mimicking TCR specificity **Eur J immunol, 40(6):1552-65**
- 31) **McCallum SJ, Wu WJ, Cerione RA (1996)** *Identification of a Putative Effector for Cdc42Hs with High Sequence Similarity to the RasGAP related protein, IQGAP1 and a Cdc42 Binding Partner with Similarity to IQGAP2* **J. Biol. Chem., 271(36):21732-21737**
- 32) **Model P, Russel M (1988)** *Filamentous phages*; **New York, Plenum Press**
- 33) **Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM, Milford EL (1997)** *HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry*; **Transplantation. 1997 Oct 15;64(7):1017-27**
- 34) **Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986)** *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*; **Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol. 51 Pt 1, 263-273**
- 35) **Munks MW, Pinto AK, Doom CM, Hill AB (2007)** *Viral interference with antigen presentation does not alter acute or chronic CD8 T cell*

- immunodominance in murine cytomegalovirus infection. J. Immunol. 178:7235-7241*
- 36) Parcej D, Tampé R (2010) *ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition; Nat Chem Biol 6(8):572-80*
- 37) Pamer E and Cresswell P (1998) *Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing; Annu Rev Immunol 16: 323-58*
- 38) Parham P, Brodsky FM (1981) *Partial purification and some properties of BB7.2, a cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28; Hum. Immunol. 3: 277-284*
- 39) Radbruch A (1989) *Flow Cytometry and Cell Sorting Springer Verlag*
- 40) Roth R (2001) *Magic Bullets Finally Find Their Mark J Am Pharm Assoc 41(3):383-391*
- 41) Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA (2006) *Magic Bullets Finally Find Their Mark Annu Rev Immunol 24:419-66*
- 42) Serwold T et al. (2002) *ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum Nature 419(6906):480-483*
- 43) Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV Jr. (1967) *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels; Biochem Biophys Res Commun 28(5):815-20*
- 44) Smith GP, Petrenko VA (1997) *Phage display; Chem. Rev. 97. 391-410*

- 45) Stern LJ and Wiley DC (1994) *Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins*; **Behring Inst Mitt 94: 1-10**
- 46) Sugimura K, Hashiguchi S, Nakashima T, Ito Y (2001) *Human single chain Fv Fragments directed to human immunoligand/receptor molecules from the phage display libraries, Phage display Technologies: Directed protein evolution Cambridge Health Tech Institute' Third Annual, April 9-10, Boston*
- 47) Tortorello ML, Reineke KF (2000) *Direct Enumeration of Enteric bacteria in Water, Beverages and Sprouts by 16S rRNA In Situ Hybridization*; **Food Microbiol. 17(3):305-313**
- 48) Townsend ARM, Rothbard J, Gotch FM, Bahadur G, Wraith D, McMichael AJ (1986) *The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides*; **Cell 44(6), 959-68**
- 49) von Boehmer H (1994) *Positive selection of lymphocytes*; **Cell 76(2), 219-228**
- 50) White J et al. (1999) *Soluble class I MHC with beta2-microglobulin covalently linked peptides: specific binding to a T cell hybridoma*; **J Immunol 162(5): p. 2671-6**
- 51) Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, Sissons JG (1996) *The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: Frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL*; **J Virol 70; 7569-7579**

- 52) Winter G, Milstein C (1991) *Man-made antibodies* **Nature** 349:293-299
- 53) Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR (1994) *Making antibodies by phage display technology* **Annu. Rev. Immunol.** 12, 433-455
- 54) Yewdell JW, Bennink JR (1997) *Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes*; **Adv. Immunol.** 52:1-123
- 55) Yewdell JW et al. (1999) *Generating MHC class I ligands from viral gene products*; **Immunol Rev** 172: 97-108
- 56) Yewdell JW, Hill AB (2002) *Viral interference with antigen presentation*; **Nat. Immunol.** 3: 1019-1025
- 57) Yewdell JW (2011) *DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing*; **Trends Immunol.** 32(11):548-58
- 58) York IA et al. (1999) *Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation*; **Immunol Rev** 172: 49-66



## 8 Abkürzungsverzeichnis

TZR	T-Zell-Rezeptor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
HLA	Humane Leukozyten Antigene
CD	cluster of differentiation
APC	antigen presenting cell
Da	Dalton
b2m	b2-Mikroglobulin
ER	Endoplasmatischen Retikulum
FWR	framework region
CDR	complementarity determining region
scFv	single chain Fragment variable
HCMV	humane Cytomegalievirus
Fab	Fragment antigen binding
PBS	phosphate buffered saline
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HRP	Horseradish peroxidase HRP
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TAP	transformation associated protein
PE	phycoerythrin
GMean	Geometric mean

## 9 Lebenslauf

Name: Müller  
Vorname: Willy  
Geburtsdatum: 26.05.1966  
Geburtsort: Großrosseln (Saarland)  
Familienstand: verheiratet  
Anschrift: Prinzenweg 18, 93047 Regensburg

### **Schule:**

1972 – 1976 Grundschole Großrosseln  
1976 – 1985 Real-Gymnasium Völklingen (Abitur)

### **Studium:**

1986 – 1994 Studium der Physik (Universität des Saarlandes, Saarbrücken)  
1994 – 1997 Studium „Europäisches Diplom in Umweltwissenschaften“  
(Universitaire Arlon, Belgien)  
2002 – 2008 Studium der Humanmedizin (Universität des Saarlandes,  
Homburg)

### **Berufliche Tätigkeit:**

1995 – 1997 Uniklinikum Freiburg (Technischer Angestellter im Rahmen  
eines Projektes der EU-Kommission)  
1997 – 1999 Existenzgründung im Bereich Öko-Shopping im Internet  
(Braunschweig)  
1999 – 2002 AOL Deutschland, Saarbrücken (Mitarbeiter in der  
Statistikabteilung)  
2008 – 2009 SHG-Klinik Saarbrücken, Psychiatrie (Assistenzarzt)  
seit 01.09.2009 Medizinische Einrichtungen des Bezirks Oberpfalz in  
Regensburg (Assistenzarzt in Kliniken: Psychiatrie, Forensik  
und Neuro-Reha)